

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Solu- ja molekyylibiologia

2012

Anne Toivanen

EGFR-MUTAATIOKITIN VERIFIOINTI



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Anne Toivanen

EGFR-MUTAATIOKITIN VERIFIOINTI

Epidermaalinen kasvutekijäreseptori (EGFR) välittää solunulkoisia viestejä solun sisäosiin, osallistuen solujen kasvun ja lisääntymisen säätelyyn. Se esiintyy useissa solutyypeissä. Ei-pienisoluisessa keuhkosyövässä on havaittu useita *EGFR*-geenin virheitä, jotka kohdistuvat reseptorin tyrosiinikinaasidomeeniin. Geenivirheiden vaikutuksesta EGFR yliaktivoituu johtaen kasvusignaalien moninkertaistumiseen ja lopulta solun muuntumiseen syöpäsoluksi.

Geeniteknen kehitys on mahdollistanut syöpäkudokseen kohdistuvien täsmälääkkeiden valmistamisen. Mutaatiotestauksella voidaan määrittää keuhkosyöpäkudoksessa mahdollisesti esiintyvät *EGFR*:n geenivirheet. Tuloksen perusteella potilaalle voidaan määrätä täsmälääkityksenä ns. tyrosiinikinaasiestäjiä, jotka vaikuttavat elimistössä suoraan solujen virheellisen EGFR:n toimintaan ja hillitsevät sitä kautta pahanlaatuista kasvua.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli testata AmoyDx:n EGFR-mutaatiokitin soveltuvuutta käytössä olevan ja markkinoilta poistuvan kitin tilalle. Kitin testaus suoritettiin ajamalla mutaatiostatuksesta tunnettuja näytteitä reaaliaikaisella kvantitatiivisella PCR:llä (qPCR). qPCR-ajojen tulokset analysoitiin ja niitä verrattiin aikaisempiin tuloksiin.

Työn keskeiset tulokset osoittivat, että AmoyDx:n kitti soveltuu *EGFR*-mutaatiotutkimuksiin. Yhteensä analysoitiin 24 potilasnäytettä (N=24), joista 23:sta saatiin aiempaa vastaava tulos. Yhden näytteen tulos jäi hieman uuden kitin ohjeistettujen raja-arvojen ulkopuolelle. Standardireaktioiden tulosten perusteella voitiin päätellä, että kaikki kitin mutaatioreagenssit toimivat hyvin. Kaiken kaikkiaan opinnäytetyön tavoitteet saavutettiin ja menetelmästä kirjoitettiin työohje.

ASIASANAT:

Epidermaalinen kasvutekijäreseptori, ei-pienisolainen keuhkosyöpä, tyrosiinikinaasiestäjä, reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR, mutaatiotestaus.

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree programme in Biomedical Laboratory Sciences | Cell and molecular biology

December 2012 | 36+6

Instructors: Docent Soili Kytölä, MHS Sc Leila Tiilikka and Medical Laboratory Technologist Anne Sund

Anne Toivanen

VERIFICATION OF EGFR MUTATIONS KIT

Epidermal growth factor receptor (EGFR) mediates extracellular signals to internal parts of the cell, participating in regulation of the cell's growth and proliferation. It is expressed in several cell types. Various *EGFR* gene mutations have been detected in non-small cell cancer. Mutations affect the tyrosine kinase domain of the receptor. This leads to overactive EGFR and multiplication of the growth signals. Ultimately, the cell converts itself to a cancer cell.

Development of genetic technologies has enabled manufacturing of targeted drugs. By mutation testing it is possible to determine existing *EGFR* mutations in lung cancer tissue. On the basis of the results patient can start a tyrosine kinase inhibitor medication. It affects, as a targeted drug directly to the function of the mutated EGFR in cells and inhibits malignant growth.

The purpose of this work was to verify the feasibility of the AmoyDx EGFR29 Mutations Detection kit in replacing currently used kit. Testing of the kit was done by running the known patient samples with real-time quantitative PCR (qPCR). Results of the qPCR were analyzed and compared to the earlier results.

The key results indicated that AmoyDx kit apply for the *EGFR* mutation studies. Total of 24 samples (N=24) was analyzed. 23 of them gave comparable results with the earlier studies. One sample was determined as negative based on the limits defined by the kit's instruction manual. Results from standards suggested that all reagents included in the kit worked well. Altogether, the set goals for the thesis were achieved and a work instruction was written.

KEYWORDS:

Epidermal growth factor receptor, Non-small cell lung cancer, tyrosinekinase inhibitor, realtime quantitative PCR, mutation testing

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	5
2 OPINNÄYTETYÖN TEOREETTINEN VIITEKEHYS	6
2.1 Epidermaalinen kasvutekijäreseptori (EGFR)	6
2.2 EGFR:n mutaatiot ja ei-pienisoluinen keuhkosyöpä	6
2.3 Tyrosiinikinaasiestäjät	8
2.4 EGFR:n laboratoriodiagnostiikka	9
3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET	10
4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS	11
4.1 Tutkimusaineisto	11
4.2 Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR tutkimusmenetelmänä	12
4.2.1 AmoyDx-kitti	15
4.3 Tutkimuksen kulku	17
4.3.1 qPCR-ajot	17
4.3.2 Tilastolliset testit	20
4.3.3 Työohje	21
5 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU	23
5.1 Sopivan DNA-pitoisuuden määrittäminen	23
5.2 qPCR-ajojen toistettavuus	24
5.3 Kittien vertailu	26
6 POHDINTA	31
6.1 Tulosten luotettavuuden arviointi	31
6.2 Opinnäytetyön eettisten näkökohtien tarkastelu	32
6.3 Johtopäätökset	32
LÄHTEET	34

LIITTEET

- Liite 1. Opinnäytetyön tutkimuslupahakemus
- Liite 2. Pipetointikaavio näytelaimennoksille ja AmoyDx-kitin reagensseille
- Liite 3. AmoyDx-kitin qPCR-ajojen tulokset
- Liite 4. Therascreen-kitin qPCR-ajojen tulokset

KUVIOT

Kuvio 1. EGFR:n liiallisen aktivaation vaikutukset soluissa.	7
Kuvio 2. Mutaatioalueen monistaminen DNA:sta.	13
Kuvio 3. Scorpions-alukkeiden toiminta.	14
Kuvio 4. Käytetty PCR-ohjelma/ AmoyDx-kitti.	18
Kuvio 5. Esimerkki negatiivisen näytteen qPCR-monistumiskäyrästä.	19
Kuvio 6. Esimerkki mutaatioposiitivisen näytteen qPCR-monistumiskäyrästä.	19
Kuvio 7. Kontrolli- ja mutaatioposiitivisten Ct-arvojen vaihtelu/ 1-5 ng/μl.	23
Kuvio 8. Tuplapositiivisen näytteen 24 qPCR-monistumiskäyrät.	24
Kuvio 9. AmoyDx-kitin standardien tulosten vaihtelu esitettynä laatikkojanakuviona.	25
Kuvio 10. Sirontakuvio kittien kontrolliarvojen riippuvuudesta.	27

TAULUKOT

Taulukko 1. AmoyDx-kitin määrittämisalueen 29 mutaatioita.	16
Taulukko 2. AmoyDx-kitin raja-arvoja eri mutaatioille.	20
Taulukko 3. Standardien tunnuslukuja.	25
Taulukko 4. Korrelaatiokerroin kittien kontrolli-Ct-arvoista laskettuna.	27
Taulukko 5. Regressiosuoran yhtälön kertoimet/ kontrolliarvot.	28
Taulukko 6. Kittien vertailua tunnuslukujen avulla.	29
Taulukko 7. Kittien vertailu variaatiokertoimien (suhteelliset hajonnat) avulla.	29
Taulukko 8. Normaali jakaumatestausta mutaatio- Δ Ct-arvoille.	30
Taulukko 9. Kittien vertailu parierojen t-testin avulla mutaatio- Δ Ct-arvoille.	30

1 JOHDANTO

Genetiikan tutkimukset ovat nykyisin yhä enemmän rutiinidiagnostiikkaa. Tautia aiheuttavia geenivirheitä eli mutaatioita tutkimalla voidaan varmistaa diagnoosi tai toisaalta sulkea pois perinnöllisen taudin mahdollisuus potilaalla, jonka kliiniset löydökset sopivat kyseiseen taudinkuvaan. Geenitestausta käytetään myös esimerkiksi sairastumisalttiuden määrittämiseen sekä sikiödiagnostiikassa. (Orpana & Huoponen 2006.)

Osa ihmisen mutaatioista ei ole synnynnäisiä, vaan ne kehittyvät ajan myötä erilaisten solumuutosten yhteydessä. Pahanlaatuisissa kasvaimissa tavataan tällaisia somaattisia mutaatioita, joista useita on löydetty kasvutekijäreseptorigeeneistä. (Lewin 1994.) Selvitetyt molekyylitason muutokset geeneissä ovat edistäneet täsmälääkkeiden kehitystä. Tämä ajankohtainen tutkimusalue on tuonut mukanaan entistä kohdennetummat syöpäterapiat. (Kervinen & Gahmberg 2004; Zhang ym. 2007.)

Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin laboratoriossa (HUSLAB) on käytössä reaaliaikaiseen kvantitatiiviseen polymeraasiketjureaktioon (PCR) pohjautuva menetelmä epidermaalisen kasvutekijäreseptorigeenin (*EGFR*) yleisimpien patologisten mutaatioiden selvittämiseksi. Kyseistä menetelmää käytetään ei-pienisoluisista keuhkosityöpää sairastavien potilaiden kudospätkien diagnostiikassa (HUSLAB ohjekirja 2012). Tässä keuhkosityöpätyypissä esiintyville *EGFR*:n mutaatioille on saatavilla täsmälääkkeitä. Lääkkeet toimivat kuitenkin vain tiettyjen mutaatioiden kohdalla (Riely ym. 2006), minkä vuoksi geenitestaus on tärkeää ennen kalliin lääkehoidon aloittamista.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli verifioida AmoyDx:n *EGFR*-mutaatiotestauksessa käytettävä PCR-kitti, markkinoilta poistuvan ja tällä hetkellä käytössä olevan (Therascreen-kitti, DxS/Qiagen) kitin tilalle. Tavoitteena oli varmistaa luotettavan *EGFR*-mutaatiotestauksen jatkuminen laboratoriossa.

2 OPINNÄYTETYÖN TEOREETTINEN VIITEKEHYS

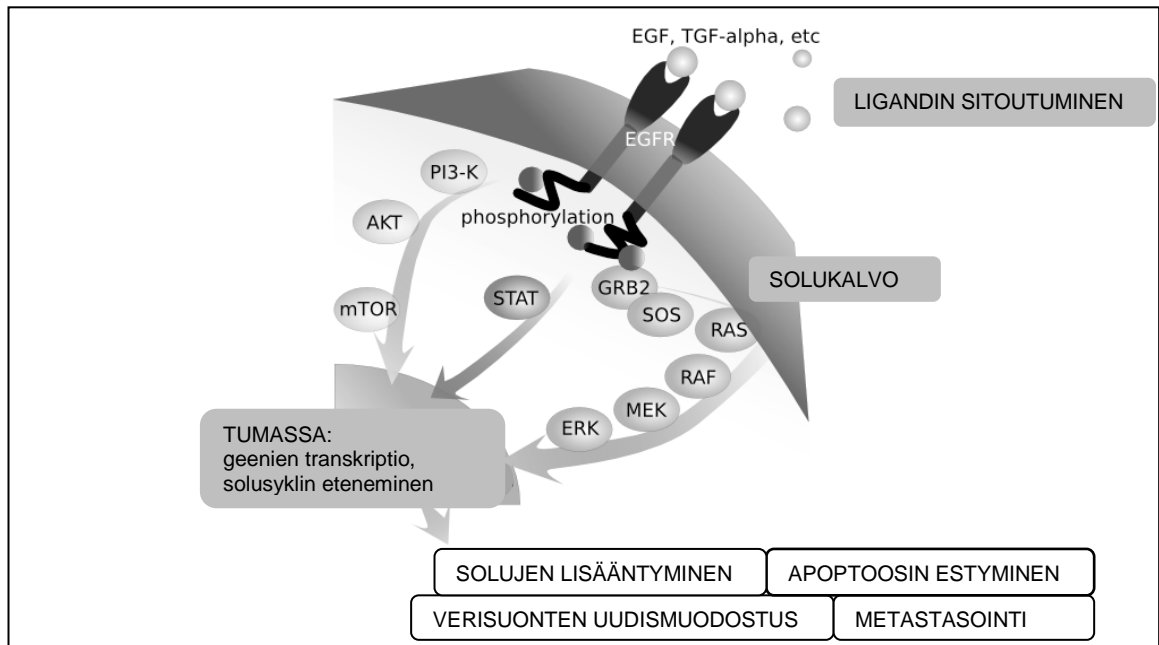
2.1 Epidermaalinen kasvutekijäreseptori (EGFR)

Epidermaalinen kasvutekijäreseptori (EGFR, engl. Epidermal Growth Factor Receptor) on solukalvon läpäisevä glykoproteiini, jonka solunsisäinen domeeni toimii tyrosiinikinaasina (Alberts ym. 1994). EGFR ekspressoituu epiteelikudoksessa, hermostoa muodostavassa kudoksessa sekä sikiöaikaisessa mesenkymaalikudoksessa (Bethune ym. 2010). Reseptorin solunulkoinen osa kykenee sitomaan kasvutekijän. Ligandin sitoutuminen saa aikaan reseptorin konformaation muutoksen, jonka seurauksena solukalvolla olevat monomeeriset reseptorimolekyylit dimerisoituvat. Dimerisaation seurauksena niiden sytoplasmiset domeenit tulevat lähelle toisiaan. Tämän kontaktin stabilisoituminen aiheuttaa reseptorien sytoplasmisen rakenteen avautumisen, mikä mahdollistaa sytoplasmisten domeenien tyrosiinien keskinäisen fosforyloinnin domeenien tyrosiinikinaasien avulla. (Lewin 1994; Elenius 2006.) Fosforylaation seurauksena signaali välittyy reseptorista eteenpäin solun sisällä. Se kulkeutuu lopulta monimutkaisen reaktioketjun välityksellä solun tumaan, jossa se aikaansaa muun muassa solujen lisääntymistä. (Lewin 1994.)

2.2 EGFR:n mutaatiot ja ei-pienisoluinen keuhkosityöpä

Useiden kasvutekijäreseptorigeenien on havaittu olevan aktiivisia syövissä ja ne on luokiteltu onkogeeneiksi (Lewin 1994). Eräs näistä on epidermaalisen kasvutekijäreseptorin geeni (*EGFR*). EGFR:ää on tutkittu paljon ja havaittu, että useat sen mutaatiot aikaansaavat tyrosiinikinaasiosan yliaktivaation, mikä puolestaan johtaa solujakautumisen lisääntymiseen, ohjatun solukuoleman eli apoptoosin estymiseen, verisuonten uudismuodostumiseen ja etäpesäkkeiden muodostumiseen (metastasointi) (Hidalgo 2008; Peled ym. 2009). Kaikki edellä mainitut muutokset ovat syöpäsolujen pahalaatuisen kasvun tunnusmerkkejä (Hanahan

& Weinberg 2000.) Kuviossa 1 on esitetty yksinkertaistetusti EGFR:n aktivaation vaikutus solunsisäisiin signaalointireitteihin ja sen kautta solun toimintoihin.



Kuvio 1. EGFR:n liiallisen aktivaation vaikutukset soluissa (Muokattu kuvista Wikipedia 2012).

EGFR:n mutaatiot ovat yleisiä ei-pienisoluisessa keuhkasyövässä, joka on maailmanlaajuisesti yksi suurimmista syöpäkuolemien aiheuttajista (Kamel-Reid ym. 2012). Ei-pienisoluisen keuhkasyöpä kattaa noin 75% kaikista keuhkasyövistä (Bethune ym. 2012). EGFR:n mutaatioita tavataan erityisesti adenokarsinomeissa, naisilla ja ei-tupakoineilla (Paez ym. 2004; Riely ym. 2006).

Yleisimmät EGFR:n aktivoivat mutaatiot sijaitsevat *EGFR*-geenin eksoneissa 18-21 (Kamel-Reid ym. 2012). Näistä yli 90% on deleetioita eli häviämiä eksonissa 19 tai pistemutaatioita eksonissa 21, jotka saavat aikaan arginiinin substituution eli korvautumisen leusiinilla (L858R) (Bethune ym. 2012). EGFR on myös liiallisesti ekspressoitunut 40-80% ei-pienisoluisen keuhkasyövän kasvaimista (Ilonen 2011). Noin puolessa *EGFR*-mutaatioita sisältävistä keuhkasyövistä myös *EGFR*-geenin kopioluku on lisääntynyt (Bethune ym. 2012).

2.3 Tyrosiinikinaasiestäjät

Monien syöpien hoidossa perinteisten menetelmien rinnalle on tullut täsmälääkkeitä, jotka perustuvat pienimolekyyliisiin aineisiin, joiden vaikutus kohdentuu suoraan syöpäkudokseen. Esimerkiksi seulomalla kemiallisia kirjastoja ja tietokonemallintamalla voidaan kehittää estäjiä proteiinimolekyyleille, jotka edistävät syövän etenemistä (Kallioniemi & Mäkelä 2006).

Suomen markkinoiden ei-pienisoluiheen keuhkosityöpään käytettäviä täsmälääkkeitä ovat tyrosiinikinaasiestäjät (TKI, engl. tyrosine kinase inhibitor) gefinitibi ja erlotinibi (Ilonen 2011). Ne ovat tablettina otettavia, ruuansulatuskanavan kautta imeytyviä täsmälääkkeitä. Niiden kohteena on EGFR:n tyrosiinikinaasidomeeni, jonka toimintaa ne estävät kiinnittymällä kinaasin adenosiinitrifosfaattia (ATP) sitovaan kohtaan. Kinaasientsyymi käyttää ATP:tä fosforinlähteeksi ja sen sitoutumisen esto TKI-lääkkeellä estää signaaloinnin etenemistä solussa. (Elenius 2006.)

TKI:t ovat tällä hetkellä hyväksytty myös ensilinjan hoidoksi edenneessä ei-pienisoluisessa keuhkosityövässä (Tohtori.fi 2012). TKI-hoitojen on havaittu olevan merkittävästi tehokkaampia niillä potilailla, joilta löytyi *EGFR*:n aktivoivia mutaatioita (Paez ym. 2004). Tutkimusten mukaan *EGFR*-mutaatiopositiivisilla potilailla TKI-lääkitys pidensi aikaa, jolloin syöpä ei edennyt verrattuna solusallapaajahoitoihin (Zhou ym., 2011; Kamel-Reid ym. 2012). Muita tekijöitä, jotka ennustavat hyvää lääkevastetta ovat aasialaistausta, tupakoimattomuus, nais-sukupuoli ja adenokarsinooma (Riely ym. 2006).

Täsmälääkityksen teho vähenee kuitenkin hoidon jatkuessa, koska lääkkeille muodostuu lopulta resistenssi (Kallioniemi & Mäkelä 2006). Näin on myös TKI-lääkityksen kohdalla. Resistenssin aiheuttajista tunnetuin on pistemutaatio, joka saa aikaan metioniinin korvautumisen treoniinilla (T790M). Tämä aminohappomuutos todennäköisesti muuttaa TKI:n sitoutumiskohtaa kinaasidomeenissa niin, ettei lääke enää pysty sitoutumaan. (Balak ym. 2006.) Lääkekehityksen myötä tulevaisuudessa potilas voi resistenssin ilmaantuessa saada mahdollisesti tilalle toisen täsmälääkkeen (Kallioniemi & Mäkelä 2006).

2.4 EGFR:n laboriodiagnostiikka

Ei-pienisoluisen keuhkosyövän hoitoa suunniteltaessa on tärkeää määrittää potilaan syövän geneettinen profiili tarkemmin. Määritysten avulla pyritään ennustamaan TKI-lääkevastetta ja lisäämään turvallisuutta, sillä täsmälääkkeillä on havaittu olevan myös sivuvaikutuksia. (Moreira & Thornton 2012.) Koska TKI-lääkitys on lisäksi kallista, on tärkeää määritellä ne potilaat, jotka todennäköisesti hyötyvät kyseisestä hoidosta (Elenius 2006).

Nykyisin on olemassa useita EGFR:ään liittyviä tutkimuksia, joiden avulla voidaan ohjata ei-pienisoluisen keuhkosyövän hoitopäätöksiä. Mutaatiotestauksella määritetään spesifisiä *EGFR*:n mutaatioita: hyviin TKI-lääkevastaisiin yhdistettäviä mutaatioita sekä resistenssimutaatioita (Bethune ym. 2012). Immunohistokemian avulla voidaan selvittää ei-pienisoluisen keuhkosyövän alatyypin (Moreira & Thornton 2012) ja näytteen edustavuus (HUSLAB ohjekirja 2012). FISH (engl. fluorescence in situ hybridisation) -menetelmä on käyttökelpoinen määrittäessä *EGFR*-geenin kopolukujen määrää (Peled ym. 2009).

Tavallisesti paksusuolen syövässä esiintyvien K-RAS:n mutaatioiden on havaittu ennustavan myös huonoa EGFR-TKI-lääkevastetta ei-pienisoluisessa keuhkosyövässä (Peled ym. 2009). Koska K-RAS on EGFR:n signaalintireitin osa, sen mutaatiomuoto voi ylläpitää signaalointia, vaikka EGFR:n toiminta olisi estetty TKI-lääkkeillä (Amado ym. 2008).

Seerumin proteomiikka on uusi lisääntyvä tutkimusalue (Peled 2009). Taguchi ym. (2007) ovat tutkineet massaspektrometrian avulla ei-pienisoluista keuhkosyöpää sairastavien potilaiden seerumin proteomiikkaprofiileja. Tuloksena on saatu luokittelu proteomiikkaprofiileista (Veristat®), joka voi mahdollisesti auttaa ennustamaan potilaiden TKI-lääkityksen vastetta (Peled ym. 2009).

3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli varmistaa toimiiko AmoyDx:n EGFR29-PCR-kitti *EGFR*-geenin mutaatiotestauksessa HUSLABin genetiikan laboratoriossa. Kitin määrittäminen kattaa 29 tavallisinta *EGFR*:n mutaatiota. Valmistaja on testannut ja validoinut kitin sekä antanut tämän perusteella raja-arvot analyysille. AmoyDx:n kitin on myös raportoitu olevan yhteensopiva laboratoriossa käytössä olevan ABI 7500 PCR -laitteen kanssa (AmoyDx EGFR29 Mutations Detection Kit -ohje).

Tällä hetkellä *EGFR*-mutaatiotestauksessa käytössä olevan Therascreen-kitin (DxS/ Qiagen) valmistus lopetetaan vuoden 2012 lopussa, minkä vuoksi on tärkeää löytää sille korvaava kitin mutaatiotestauksen jatkumisen takaamiseksi.

Opinnäytetyö oli tarkoitus toteuttaa vertailututkimuksena. Vertaamalla kiteillä saatuja tuloksia samoista potilasnäytteistä voitaisiin päätellä toimiiko AmoyDx:n kitin vastaavalla tavalla kuin Therascreen-kitti *EGFR*-tutkimuksissa. Analysoinnissa oli tarkoitus käyttää myös tilastollisia menetelmiä kiteillä saatujen tulosten välisen riippuvuuden ja parierojen kuvaamiseen. Uuden kitin toimiessa tarkoituksenmukaisesti, tavoitteena oli myös kirjoittaa menetelmästä työohje.

4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

Opinnäytetyön kokeellinen osuus tehtiin kevään 2012 aikana HUSLABin geenitiikan laboratoriossa, Helsingin Meilahdessa. Opinnäytetyö toteutettiin laboratorion henkilöstön ohjauksessa. Tutkimuslupa opinnäytetyölle (Liite 1) anottiin HUSin käytäntöä noudattaen. Aiheeltaan tehty tutkimus kuului molekyylipatologian alueeseen. Työssä käytetyt näyteaineisto ja materiaalit olivat valmiina laboratoriossa.

Tämän opinnäytetyön tutkimusstrategia oli kokeellinen. Kokeellisen tutkimuksen tunnuspiirteitä ovat muun muassa suunnitellut ja harkitut koejärjestelyt sekä numeerisessa muodossa saatavat mittaustulokset. (Hirsjärvi ym. 2009.)

4.1 Tutkimusaineisto

Tässä tutkimuksessa perusjoukon muodostivat potilasnäytteet, joista oli tutkimuspyyntö *EGFR*-geenin mutaatiotestausta varten. Testattava otos koostui 24 potilasnäytteestä, jotka valittiin aiemmin Therascreen-kitillä saatujen tulosten perusteella ja joista oli vielä jäljellä näytemateriaalia. Valinnalla on pyritty saamaan mahdollisimman heterogeeninen tutkimusaineisto, jossa esiintyisi mahdollisimman moni PCR-kitin määrittämisalueella oleva mutaatio ja jossa olisi edustettuna sekä hyviä että haasteellisia DNA-näytteitä.

Aineistosta 23 näytteen genominen DNA oli eristetty parafiinilastuista, jotka oli leikattu patologin valitsemalta näytealueelta kudosblokista. Yhdessä näytteessä näytemateriaalina oli pleuraneste. Edellytys *EGFR*-tutkimukselle on näytteen tuumorisolujen vähintään 30 %:n osuus (HUSLAB ohjekirja 2012). Koko tutkimusaineisto koostui DNA-näytteistä, jotka olivat enintään kuusi kuukautta vanhoja.

4.2 Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR tutkimusmenetelmänä

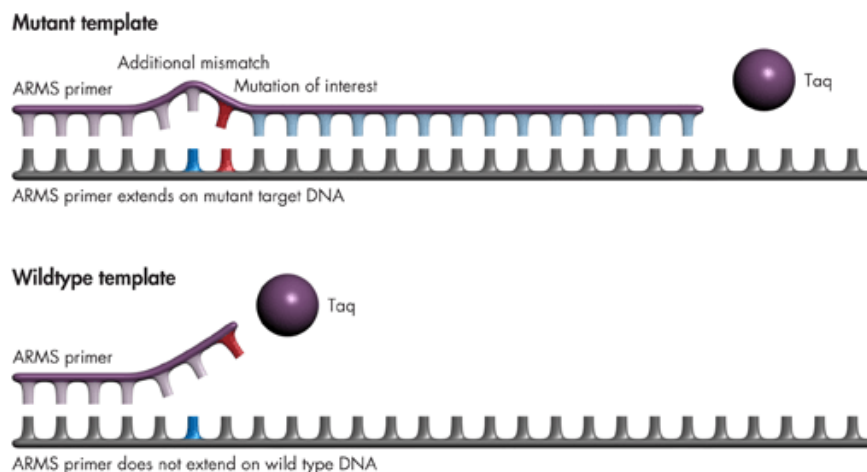
Tutkimusmenetelmänä käytettiin reaaliaikaista kvantitatiivista polymeraasiketju-reaktiota (qPCR). qPCR on monine sovelluksineen erittäin paljon käytetty menetelmä molekyylogeneettisessä diagnostiikassa (Arya ym. 2005). PCR:ssä haluttu DNA-alue voidaan monistaa monimutkaisestakin DNA-seoksesta lyhyiden oligonukleotidi-fragmenttien eli PCR-alukkeiden avulla (Wilson & Walker 2001). Reaaliaikaisessa qPCR:ssä kaksoisleimattujen fluoresoivien koettimien käyttö on mahdollistanut sen, että tuotteen määrän detektio tapahtuu samanaikaisesti tuotteen muodostumisen kanssa. Tämä on tehnyt PCR:stä yhä tehokkaampaa ja luotettavampaa (Heid ym. 1996; Arya ym. 2005).

Perinteinen PCR jakaantuu kolmeen vaiheeseen, joilla kaikilla on tietty aika ja lämpötila. Ensimmäisessä eli denaturaatiovaiheessa kaksijuosteinen DNA avautuu. Toisessa vaiheessa (annealing) lämpötilaa laskemalla saadaan aikaan alukkeiden kiinnittyminen yksijuosteisiin kohdesekvensseihin. Toimiva lämpötila tulee optimoida erikseen jokaiselle PCR-systeemille. Muuten vaarana ovat monistumisen epäonnistuminen tai ei-haluttujen tuotteiden monistuminen yhdessä kohdealueen kanssa. Kolmannessa eli pidennys-vaiheessa polymeraasientsyymi tarttuu kiinnittyneiden alukkeiden 3'-päässä olevaan vapaaseen OH-ryhmään ja saa aikaan DNA-synteesin reaktioseoksen nukleotidien avulla. (Wilson & Walker 2001.) PCR:ssä käytetään korkeaa lämpötilaa kestävä *Thermus Aquaticus*-bakteerista eristettyä Taq-polymeraasia (Saiki ym.1988; Wilson & Walker 2001).

Näitä kolmea edellä mainittua vaihetta toistetaan syklinä useita kertoja peräkkäin PCR:n edetessä. Uudet syntetisoidut DNA-juosteet toimivat myös templaatteina DNA-polymeraasille ja jokaisen syklin aikana monistuneiden DNA-alueiden määrä moninkertaistuu. Vaikka alkuvaiheessa syntyy myös pidempiä DNA-pätkiä, suurin osa tuotteista on lopulta rajautunut PCR-alukkeiden määrämälle halutulle alueelle. (Wilson & Walker 2001.)

Therascreen-kitissä EGFR-mutaatioiden spesifinen monistuminen ja niiden detektio qPCR:ssä saadaan aikaan niin kutsuttujen ARMS- ja Scorpions-tekniikoiden yhdistelmällä (Therascreen EGFR PCR Kit -käsikirja 2010).

ARMS-tekniikka (ARMS= Amplification Refractory Mutation System) perustuu siihen havaintoon, että Taq-polymeraasi etenee tehokkaasti DNA-synteesiin vain, jos PCR-alukkeen 3'-pään emäs täsmää vastinjuosteen kanssa (Newton ym. 1989). Tämän perusteella PCR-alukkeet voidaan suunnitella vastaamaan mutaatioaluetta (Kuvio 2). Mutaatiosekvenssit voidaan tällöin monistaa tehokkaasti myös näytteistä, joissa mutaatioiden osuus on pieni. (Therascreen EGFR PCR Kit -käsikirja 2010).



Mutantti-templaatti:

ARMS-alukkeen 3'-pää on kiinnittynyt vastinjuosteen täsmäävään emäkseen ja Taq-polymeraasi on aloittanut DNA-synteesin.

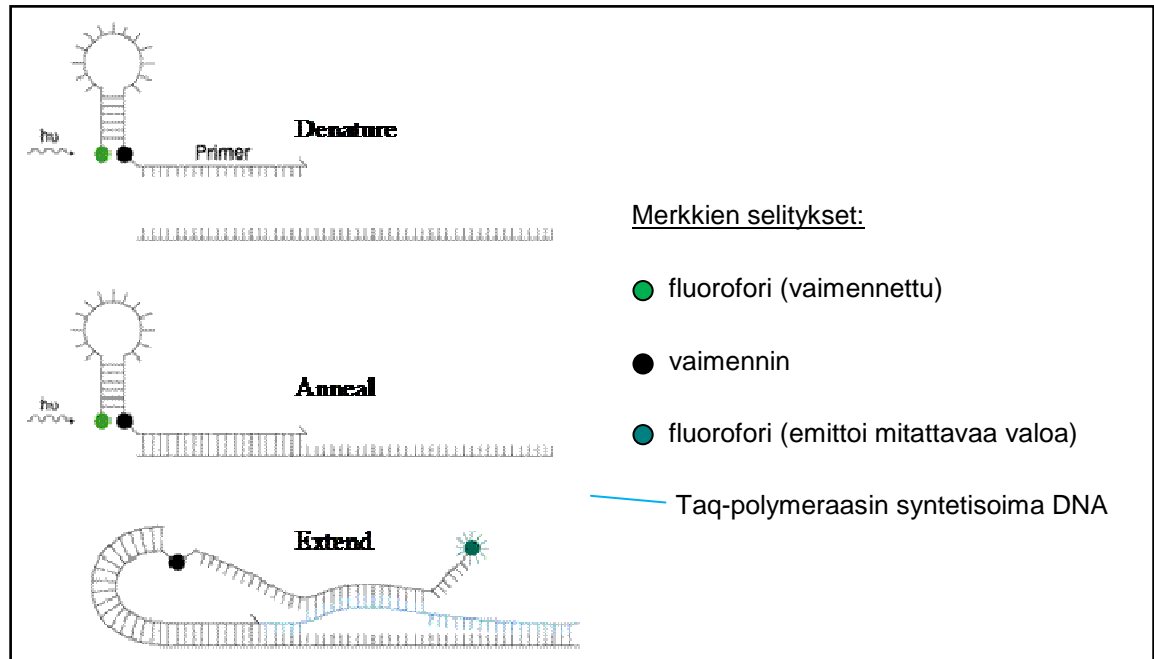
Villityypin templaatti:

ARMS-alukkeen 3'-pää ei täsmää vastinjuosteen DNA-sekvenssin kanssa, jolloin Taq-polymeraasi ei kykene aloittamaan DNA-synteesiä.

Kuvio 2. Mutaatioalueen monistaminen DNA:sta (Muokattu lähteestä http://www.qiagen.com/literature/qiagennews/weeklyarticle/11_07/e18/default.aspx).

Therascreen-kitissä monistumisen määrittämiseen käytetään Scorpions-tekniikkaa (Therascreen EGFR PCR Kit -käsikirja 2010). Scorpionit ovat koettimia (probeja), jonka toiseen päähän on kovalenttisesti kiinnitetty aluke. Koetinosan toisessa päässä on niin sanottu vaimennin ja toisessa päässä fluorofori. Koettimen sekvenssin molemmissa päissä on toisilleen täsmäävät (komplementaariset) alueet, mikä saa aikaan koetinosan muotoutumisen hiuspinni-luopin muotoiseksi, jolloin vaimennin ja koetin tulevat lähelle toisiaan. Tällä etäisyydellä vaimennin vähentää koettimen fluoresenssia (Kuvio 3, Denature- ja Anneal-

vaihe). Etäisyys näiden kahden välillä kuitenkin kasvaa PCR-reaktion aikana, kun lämpötilan muutos saa aikaan koettimen luupin aukeamisen ja kiertymisen taaksepäin kiinnittyäkseen sille täsmäävään monistuneeseen kohdesekvenssiin. Tällöin fluoresenssisignaali kasvaa ja se voidaan mitata (Kuvio 3, Extend-vaihe). (Therascreen EGFR PCR Kit –käsikirja 2010)



Kuvio 3. Scorpions-alukkeiden toiminta (Muokattu lähteestä <http://ccrhawaii.org/index.php/nucleic-acid-techniques/22-nucleic-acid-amplification-a-sequencing/22a-polymerase-chain-reaction-amplifying-nucleic-acids/22a-content-tutorial>).

Useat PCR-syklit ovat tarpeen, jotta PCR-tuotteelle saadaan riittävän suuri, taustasignaalista erottuva arvo. Taustan ylittävän fluoresenssisignaalin avulla määritetään näytteelle sen kynnyssykli eli Ct-arvo (Ct; engl. Cycle Threshold). (Therascreen EGFR PCR Kit –käsikirja 2010.) Jos näytteessä on paljon monistettavaa DNA-templaattia PCR-reaktion alussa, tarvitaan vähemmän PCR-syklejä siihen, että fluoresenssisignaali ylittää merkitsevästi taustasignaalin (Arya ym. 2005).

4.2.1 AmoyDx-kitti

AmoyDx-kitti on CE-merkitty (CE=Conformité Européenne) ja IVD-hyväksytty (IVD= In Vitro Diagnostics) Euroopan markkinolle. Eli se täyttää Euroopan unionin vaatimukset ja soveltuu lääketieteellisiin laboratoriotutkimuksiin.

AmoyDx:n kitissä on myös käytetty ARMS-tekniikkaa kuten Therascreen-kitissäkin. Fluoresenssidetektio tapahtuu niin sanotun kaksoissilmukka-koettimen avulla. Menetelmä on patentoitu, eikä siitä ole ollut saatavana tarkempaa tietoa. Valmistajan ilmoituksen mukaan kitti on kuitenkin samankaltainen DxS:n Therascreen-kitin kanssa ja soveltuu käytettäväksi ABI 7500 PCR-laitteessa.

AmoyDx-kitti sisälsi reaaliaikaisessa qPCR:ssä tarvittavat reagenssit ja sen avulla voitiin tunnistaa 29 yleisintä *EGFR*-geenin mutaatiota. Kitti sisälsi kahdeksan reagenssiseosta: yhden reagenssiseoksen kontrollille ja seitsemän reagenssiseosta mutaatioille sekä Taq-polymeraasiliuoksen. Lisäksi kitissä oli mukana standardi-DNA:ta, joka sisälsi geeniteknologisin menetelmin valmistetut templaattit kaikille kitin määritysalueen 29 mutaatiolle. (AmoyDx EGFR29 Mutations Detection Kit -ohje).

Reagenssit sisältävät PCR:ssä tarvittavia nukleotideja (dNTP), reaktiopuskurin, alukkeet ja koettimen. Kontrollin reagenssiseos sisältää alukkeet geenialueelle, joka löytyy *EGFR*-geenin vierestä. Sen avulla voidaan arvioida näytteen kokonais-DNA:n määrää ja laatua. Mutaatioiden reagenssiseoksissa on vastavasti alukkeet *EGFR*:n mutaatioille. Osa mutaatiomikseistä sisältää alukkeet usealle eri mutaatiolle samalla alueella, esimerkiksi 19-Del-mutaatiomiksi eksonin 19 kaikille tunnetuille deleetioille. (Taulukko 1).

Kaikki reagenssiseosten koettimet on leimattu fluoresoivalla FAM:lla (6-karboksifluorescein), jonka emissiota mittaamalla kyetään detektoimaan PCR-monistumista. Kukin reagenssiseos sisältää myös alukkeet sisäiselle kontrollille, jonka avulla voidaan näytteessä olevien inhibiittoreiden määrää. Sisäisen kontrollin detektio tapahtuu HEX-leimatun (HEX= 5'-Heksakloro-fluorescein-

CE fosforodamiitti) koettimen avulla ja se mitataan laitteen JOE-kanavalla. HEX:n fluoresenssiemission aallonpituusalue on eri kuin FAM:lla, jolloin se pystytään erottamaan varsinaisesta mutaatiomonistumisesta.

Taulukko 1. AmoyDx-kitin määrittämisalueen 29 mutaatiota. (AmoyDx EGFR29 Mutations Detection Kit -ohje).

Name	Mutation	Exon	Base Change	Cosmic ID
Ex18-mutant-1	G719A	18	2156G>C	6239
Ex18-mutant-2	G719S	18	2155G>A	6252
Ex18-mutant-3	G719C	18	2155G>T	6253
Ex19-mutant-1	E746_A750del (1)	19	2235_2249del15	6223
Ex19-mutant-2	E746_A750del (2)	19	2236_2250del15	6225
Ex19-mutant-3	L747_P753>S	19	2240_2257del18	12370
Ex19-mutant-4	E746_T751>I	19	2235_2252>AAT(complex)	13551
Ex19-mutant-5	E746_T751del	19	2236_2253del18	12728
Ex19-mutant-6	E746_T751>A	19	2237_2251del15	12678
Ex19-mutant-7	E746_S752>A	19	2237_2254del18	12367
Ex19-mutant-8	E746_S752>V	19	2237_2250>T(complex)	12384
Ex19-mutant-9	E746_S752>D	19	2238_2255del18	6220
Ex19-mutant-10	L747_A750>P	19	2238_2248>GC(complex)	12422
Ex19-mutant-11	L747_T751>Q	19	2238_2252>GCA(complex)	12419
Ex19-mutant-12	L747_E749del	19	2239_2247del19	6218
Ex19-mutant-13	L747_T751del	19	2239_2253del15	6254
Ex19-mutant-14	L747_S752del	19	2239_2256del18	6255
Ex19-mutant-15	L747_A750>P	19	2239_2248TTAAGAGAAG>C(complex)	12382
Ex19-mutant-16	L747_P753>Q	19	2239_2258>CA(complex)	12387
Ex19-mutant-17	L747_T751>S	19	2240_2251del12	6210
Ex19-mutant-18	L747_T751del	19	2240_2254del15	12369
Ex19-mutant-19	L747_T751>P	19	2239_2251>C(complex)	12383
Ex20-mutant-1	T790M	20	2369C>T	6240
Ex20-mutant-2	S768I	20	2303G>T	6241
Ex20-mutant-3	H773_V774insH	20	2319_2320insCAC	12377
Ex20-mutant-4	D770_N771insG	20	2310_2311insGGT	12378
Ex20-mutant-5	V769_D770insASV	20	2307_2308insgccagcgtg	12376
Ex21-mutant-1	L858R	21	2573T>G	6224
Ex21-mutant-2	L861Q	21	2582T>A	6213

4.3 Tutkimuksen kulku

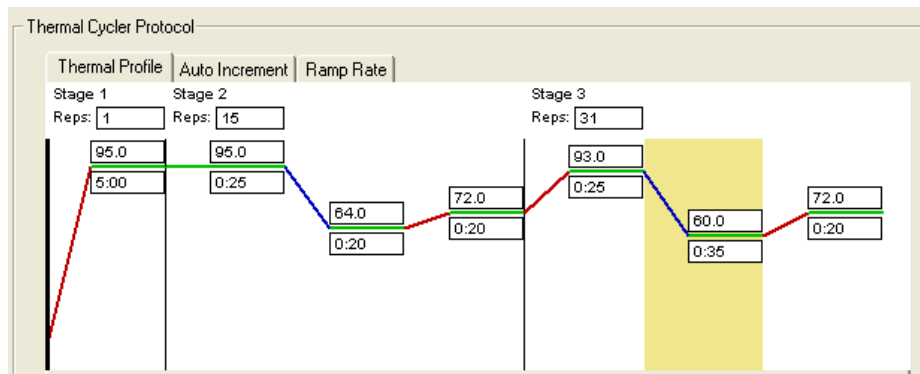
Ensimmäisessä vaiheessa testattiin uuden AmoyDx:n EGFR29 –kitin toimintaa TheraScreen-kitillä käytetyillä PCR-olosuhteilla sekä 20 ng/μl näytepitoisuudella, jolloin toimiessaan voitaisiin toimia samoilla jo olemassa olevilla työohjeilla ja taulukoilla. Uusi kitti ei kuitenkaan toiminut näissä olosuhteissa, joten siirryttiin käyttämään AmoyDx:n ohjeessa kuvattuja PCR-ajon asetuksia (AmoyDx EGFR29 Mutations Detection Kit -ohje). Näillä asetuksilla näytepitoisuudella 20 ng/μl saatiin matalia Ct-arvoja sekä vääriä positiivisia tuloksia verrattaessa aiempiin Therascreen-kitin tuloksiin. Tämä viittasi liian suureen näytepitoisuuteen ja sopivamman DNA-pitoisuuden löytämiseksi kokeilimme seuraavaksi 1, 2, 3 ja 5 ng/ μl:n DNA-pitoisuuksia. Saatujen tulosten perusteella valittiin varsinaisissa potilasnäytetestauksissa käytetty DNA-pitoisuus.

4.3.1 qPCR-ajot

qPCR:n suunnitteleminen aloitettiin täyttämällä pipetointikaaviot näytteille ja reagensseille (Liite 2) ja suunnittelemalla ajopohja näytteiden paikoille 96-kuoppalevyille. Ajopohjalle myös muutettiin AmoyDx-kitin ajon PCR-ohjelma (kuvio 4). ABI 7500 PCR -laite (Applied Biosystems) käynnistettiin, ja suunniteltu ajopohja siirrettiin muistitikun avulla PCR-laitteelle. Kustakin näytteestä tehtiin kahdeksan reaktiota. Lisäksi kussakin ajossa oli mukana vesikontrolli ja standardi kullekin reaktiomikseille. Kaikki pipetoinnit tehtiin steriilisti laminaarivirtauskaapeissa. Pipetoitavat näytteet ja reagenssit sulatettiin huoneenlämmössä, sekoitettiin ja ne sentrifugoitiin nopeasti (pikasentrifugointi).

DNA-näytteistä tehtiin 3 ng/μl:n näytelaimennokset PCR-veteen (DEPC-käsitelty vesi, BioChemica). Tämän jälkeen pipetoitiin DNA-templaattit (laimennetut potilasnäytteet ja standardi-DNA) sekä vesikontrollit 96-kuoppalevyille (4.7 μl/kuoppa) (Applied Biosystems 96-well optical reaction plate with barcode). AmoyDx-kitin PCR-miksit valmistettiin eppendorffputkiin pipetoimalla reagenssiseosta ja Taq-polymeraasia pipetointikaavion mukaisesti. Taq-polymeraasi-

entsyymi otettiin huoneenlämpöön vain pipetoinnin ajaksi. Tämän jälkeen kontrolli- ja mutaatiomiksit lisättiin 96-kuoppalevylle pipetoimalla 35,3 µl/ kuoppa. Kuoppalevyn päälle kiinnitettiin suojakalvo lastan avulla, ja levyä sentrifugoitiin 1 min, 2000 rpm (Hettich Rotina 38R). Lopuksi kuoppalevy siirrettiin PCR-laitteeseen ja ajo käynnistettiin.



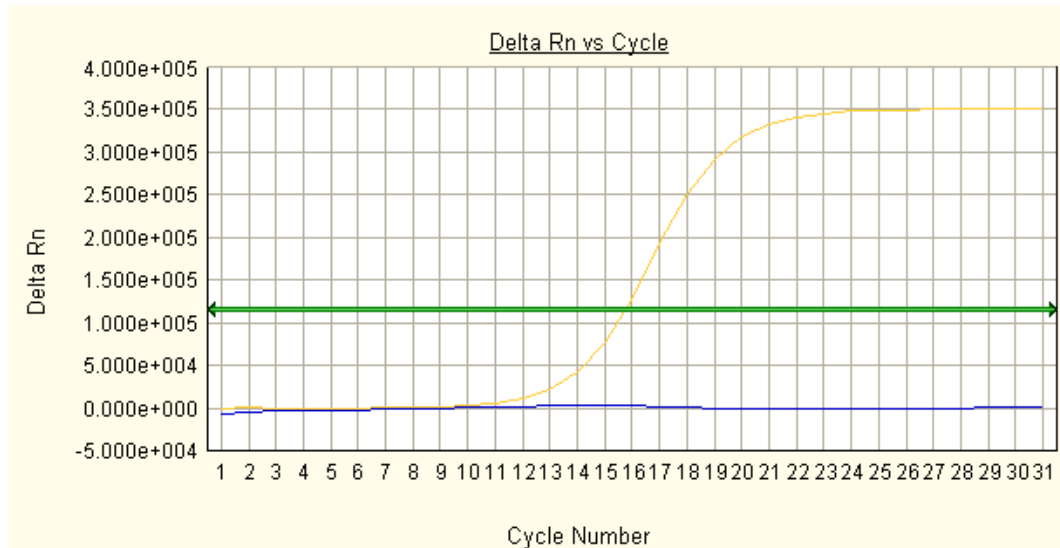
Kuvio 4. Käytetty PCR-ohjelma/ AmoyDx-kitti.

Pipetointikaaviossa (liite 2) on myös ohje tiivistetysti qPCR-pipetointien suorituksesta.

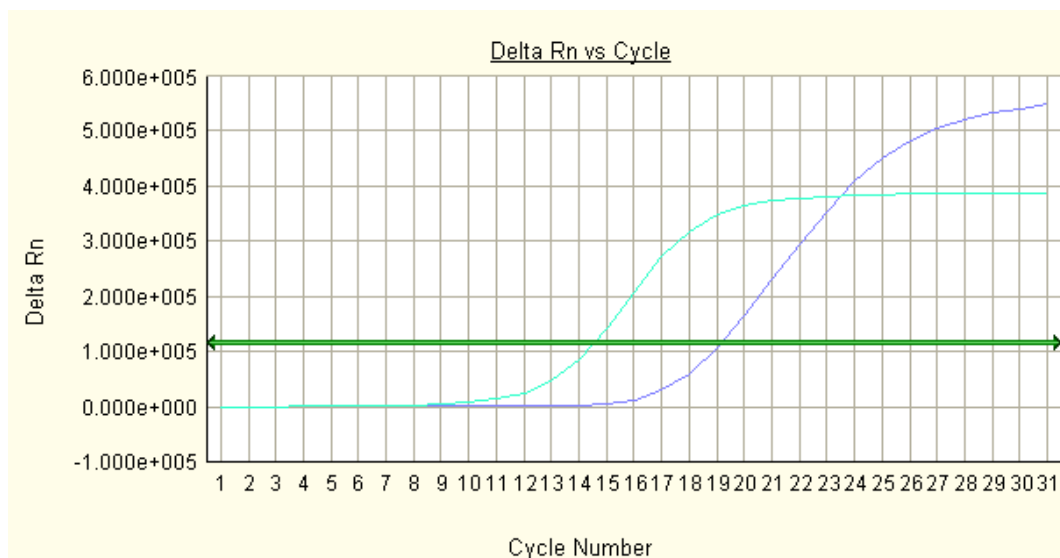
qPCR-ajojen jälkeen ajotiedosto siirrettiin tietokoneelle, jossa sen analyysi tehtiin 7500 System SDS software -ohjelmalla (Applied Biosystems) noudattaen Therascreen-kitin ohjetta soveltuvin osin. Tulokset saatiin numeerisina Ct-arvoina ja monistumista kuvaavina amplifikaatiokäyrinä.

Kynnystaso määritettiin erikseen sekä FAM- että JOE-fluoresenssikanaville, joissa se asetettiin manuaalisesti amplifikaatiokäyrien eksponentiaalisen vaiheen lineaariselle osalle.

Seuraavana on kaksi esimerkkiä AmoyDx-kitin qPCR-ajoista saaduista amplifikaatiokäyristä. Ensimmäisessä, negatiivisen näytteen kuviossa vain kontrollireaktio ylittää kynnystason (Kuvio 5). Toisessa kuviossa monistuu myös mutaatioreaktio kontrolliin verrattuna suuremmalla Ct-arvolla (Kuvio 6). Kynnystaso näkyy kuvissa vihreänä. Tuloskäyrät saatiin delta Rn ja qPCR-syklinumeron määrittämällä asteikoilla. Tietokoneohjelma laskee delta Rn -arvon vähentämällä taustafluoresenssin PCR-tuotteen fluoresenssista (Arya ym. 2005).



Kuvio 5. Esimerkki negatiivisen näytteen qPCR-monistumiskäyrästä.



Kuvio 6. Esimerkki mutaatioposiivisen näytteen qPCR-monistumiskäyrästä.

qPCR-ajojen numeerisena datana saatuja Ct-arvoja tarkasteltiin suhteessa AmoyDx-kitin ohjeessa annettuihin raja-arvoihin. Standardireaktioiden Ct-arvot tuli ohjeen mukaan olla alle 20, kontrollireaktioiden 15~21 ja vesikontrollien negatiivisia. Mutaatioreaktioiden raja-arvot näkyvät taulukossa 2 seuraavalla sivulla.

Taulukko 2. AmoyDx-kitin raja-arvoja eri mutaatioille. (AmoyDx EGFR29 Mutations Kit -ohje).

Tube No.		1	2	3	4	5	6	7
Name of Mutation		19-Del	L858R	T790M	Insertions	G719X	S768I	L861Q
Strong Positive	Mutant Ct Value	Ct<26	Ct<26	Ct<26	Ct<26	Ct<26	Ct<26	Ct<26
	Mutant Content	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%	>5%
Weak Positive	Mutant Ct Value	26≤Ct <29	26≤Ct <29	26≤Ct <28	26≤Ct <29	26≤Ct <29	26≤Ct <29	26≤Ct <29
	ΔCt Cut-off value	11	11	7	9	7	8	8
	Mutant Content	1%~5%	1%~5%	1%~5%	1%~5%	1%~5%	1%~5%	1%~5%
Negative	Mutant Ct Value	Ct≥29	Ct ≥29	Ct ≥28	Ct ≥29	Ct ≥29	Ct ≥29	Ct ≥29

Raja-arvojen tarkastamisen jälkeen numeerinen data siirrettiin Excel-ohjelmaan EGFR-tutkimukselle määritetylle makrotus-pohjalle, jonka avulla ohjelma laski mutaatiopositivisten näytteiden ΔCt-arvot (mutaatio Ct – kontrolli Ct).

Sopivan näytepitoisuuden testauksesta tehtiin Excel-ohjelmalla kuviot qPCR-ajojen kontrollien Ct-arvojen sekä mutaatio-Ct-arvojen vaihtelusta eri pitoisuuksilla.

AmoyDx-kitin qPCR-ajojen tulokset potilasnäytteistä määriteltiin mutaatiopositiviseksi tai negatiiviseksi kitin ohjeissa annettujen raja-arvojen (Taulukko 2) perusteella. Saadut tulokset taulukoitiin ja niitä verrattiin Therascreen-kitillä saatuihin tuloksiin.

4.3.2 Tilastolliset testit

Tulosaineistoa käsiteltiin myös tekemällä tilastollisia analyysejä SPSS-ohjelmistolla (SPSS for Windows, versio 19). Tulokset esitettiin taulukkoina ja kuvioina.

qPCR-ajojen toistettavuutta määritettiin tarkastelemalla standardien Ct-arvoja. Tulosten hajontaa eri ajojien välillä havainnollistettiin laskemalla SPSS-ohjelmistolla tilastollisia tunnuslukuja, joista keskihajonnat esitettiin lisäksi laattikojanäkymänä.

Kittien välistä riippuvuutta määritettiin korrelaatiotestausten avulla. AmoyDx-kitin ja Therascreen-kitin kontrollien Ct-arvojen välistä lineaarista riippuvuutta määritettiin laskemalla SPSS-ohjelmistolla Pearsonin korrelaatiokerroin ja tekemällä regressioanalyysi. Edellytys Pearsonin korrelaatiokertoimen laskemiselle on vähintään välimatka-asteikon tasoiset muuttujat (Heikkilä 2005), mikä täyttyi tulostemme osalta. Kontrollien riippuvuutta havainnollistettiin sirontakuvion avulla.

Eri suuruusluokkaa olevien muuttujien hajonnat on mahdollista esittää vertailukelpoisina variaatiokertoimien avulla (Heikkilä 2005). Variaatiokerroin (%) ilmoittaa muuttujien suhteellisen hajonnan (Tilastokeskus 2012). AmoyDx- ja Therascreen-kittien tulosarvot ovat eri suuruusluokkaa johtuen qPCR-ajojen erilaisista asetuksista. Saadut qPCR-tulokset olivat suhdeasteikollisia, jolloin variaatiokertoimien edellytykset täyttyivät ja ne voitiin laskea. Variaatiokertoimet laskettiin kaavalla $\text{keskihajonta} \div \text{keskiarvo} \times 100\%$. Variaatiokertoimilla vertailtiin keskenään kittien kontrolli-Ct-arvoja, mutaatioposiitivisten näytteiden Ct-arvoja sekä näistä laskettuja ΔCt -arvoja.

Mutaatioposiitivisten näytteiden osalta kittien tulosten välistä vertailua tehtiin testaamalla parierojen tilastollista merkitsevyyttä ΔCt -arvoista. Nollahypoteesina testeille oli, että AmoyDx-kitillä saadut potilasnäytteiden tulokset eivät eroa aiemmista Therascreen-kitin tuloksista. Ensimmäisessä vaiheessa mutaatioposiitivisten näytteiden ΔCt -arvoille tehtiin normaalijakaumatestaus. Tämän perusteella tehtiin lopuksi parierojen t-testi.

4.3.3 Työohje

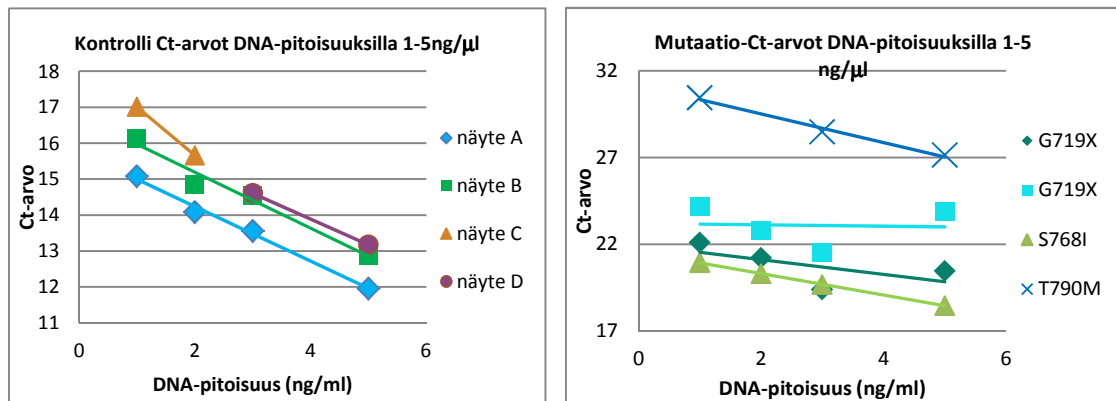
AmoyDx-kitin käytöstä kirjoitettiin työohje (*EGFR*-geenin mutaatioanalyysi kudoksenäytteestä/ AmoyDx-kitti) käyttäen apuna jo olemassa olevaa *EGFR*-mutaatiotestauksen Therascreen-kitin ohjetta (*EGFR*-geenin mutaatioanalyysi kudoksenäytteestä). Ohje muutettiin vastaamaan AmoyDx-kitin mukaista qPCR-ajoa ja tulosten analysointia. Kirjoitus tehtiin AmoyDx-kitin ohjeen (AmoyDx

EGFR29 Mutations Detection Kit -ohje) sekä testauksesta saatujen tulosten ja käytännön kokemuksen perusteella.

5 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

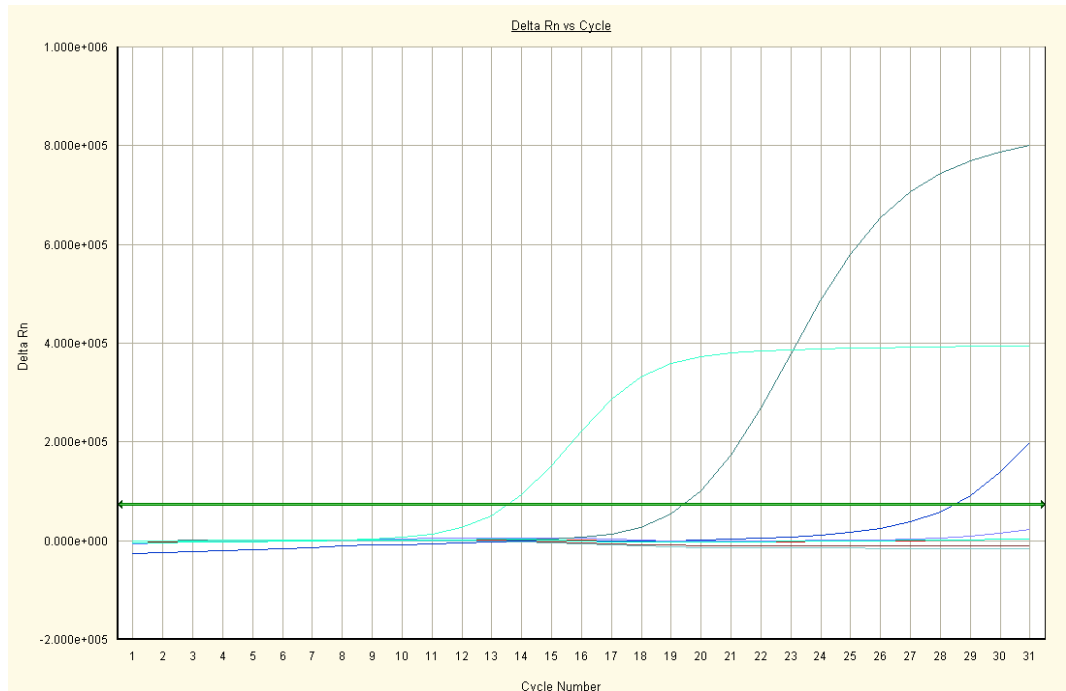
5.1 Sopivan DNA-pitoisuuden määrittäminen

Kuvio 7 havainnollistaa eri DNA-pitoisuuksien (1-5 ng/μl) vaikutusta kontrolli- ja mutaatio-Ct-arvoihin käytettäessä AmoyDx-kittiä. Kontrollien Ct-arvot laskevat lähes lineaarisesti DNA-pitoisuuden kasvaessa. Samankaltainen muutos on nähtävissä mutaatio-Ct-arvojen kohdalla. Tulosten perusteella potilasnäytteiden testauksessa valittiin käytettäväksi DNA-pitoisuudeksi 3 ng/μl. Määräävinä kriteerinä valinnalle olivat kontrollien Ct-arvot, joille oli annettu suositellut raja-arvot (AmoyDx-ohje) sekä T790M-resistenssimutaation Ct-arvot. Valitulla 3 ng/μl-pitoisuudella kontrolli-Ct-arvot olivat hieman alhaisempia kuin suositellut arvot 15-21 (AmoyDx-ohje), mutta tällä pitoisuudella resistenssimutaatio saatiin paremmin esille.



Kuvio 7. Kontrolli- ja mutaatiopositivisten Ct-arvojen vaihtelu/ 1-5 ng/μl.

Kaikissa näytteissä, joista löydettiin T790M-resistenssimutaatio, mutaatio tuli esiin myöhäisillä amplifikaatiosykleillä, Ct-arvoilla 26-29 (Liite 3) ja määrittyi negatiiviseksi tai heikosti positiiviseksi kitin ohjeessa annettujen raja-arvojen (Taulukko 2, s. 20) mukaisesti. Tämä nähdään näytteen 24 (Liite 3) monistumiskäyrissä kuviossa 8. Vertailua aiempiin tuloksiin ei voitu T790M-resistenssimutaation osalta tehdä, koska Therascreen-kitti ei sisältänyt alukkeita tällä mutaatiolle.



Kuvio 8. Tuplapositiivisen näytteen 24 qPCR-monistumiskäyrät. Kynnystason ylittävät vasemmalta lukien: kontrolli-, 19Del-mutaatio sekä resistenssimutaatio T790M-reaktioiden Ct-arvot.

5.2 qPCR-ajojen toistettavuus

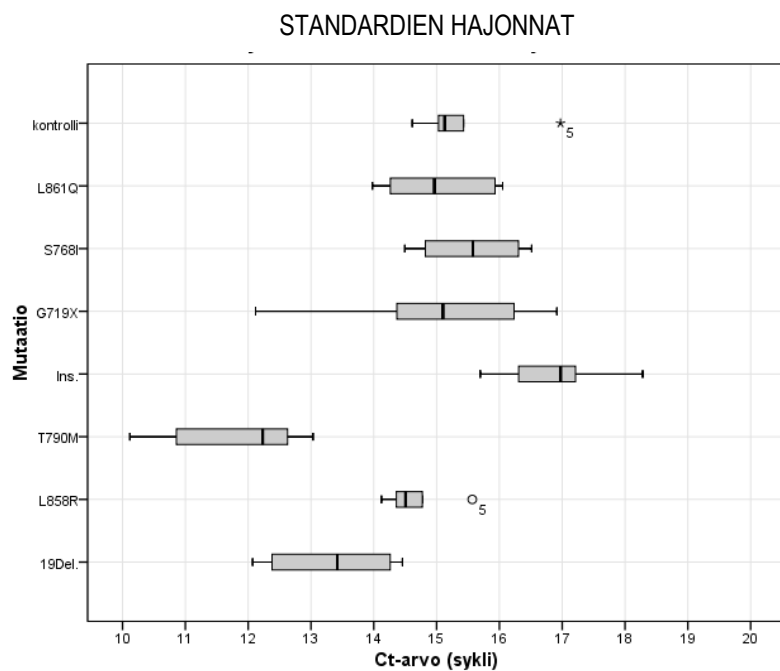
Kaikkien qPCR-ajojen standardi-Ct-arvot olivat AmoyDx-ohjeen raja-arvojen (<20) (AmoyDx EGFR29 Mutations Detection Kit -ohje) mukaiset kullekin mutaatiomiksille. Tämän perusteella standardeista saatuja tuloksia voitiin pitää onnistuneina ja päätellä, että kitin sisältämät mutaatio- ja kontrollireagenssit toimivat käytetyillä PCR-olosuhteilla hyvin.

Standardien tuloksista määritettiin myös tilastollisia tunnuslukuja SPSS-ohjelmistolla. Osalla standardeista qPCR-ajojen välillä ei ollut suurta vaihtelua ja toistettavuus oli hyvä. Keskihajonnat vaihtelivat välillä 0,50-1,7. Suurin vaihtelu oli G719X-mutaatiostandardin kohdalla, mikä nähdään myös tunnuslukujen osalta minimi- ja maksimi-arvojen melko suurena erona (4,8) (Taulukko 3, s. 25).

Taulukko 3. Standardien tunnuslukuja.

	N	Minimi	Maksimi	Keskiarvo	Keskihajonta
19Del.	6	12.1	14.5	13.3	1.1
L858R	6	14.1	15.6	14.6	.5
T790M	6	10.1	13.0	11.9	1.1
Ins.	6	15.7	18.3	16.9	.9
G719X	6	12.1	16.9	15.0	1.7
S768I	6	14.5	16.5	15.6	.9
L861Q	6	14.0	16.1	15.0	.9
kontrolli	6	14.6	17.0	15.4	.8
Valid N (listwise)	6				

Standardien tulosten hajonnat mutaatioittain on esitetty laatikkojanakuviossa (kuvio 9), jossa kukin laatikko muodostaa kvartiilivälin ja jakaantuu mediaanivii- van jakamana ala- ja yläkvartiiliin, jotka molemmat sisältävät 25% havainnoista. G719X-mutaatiostandardin osalta nähdään, että kvartiilivälille asettuvien arvo- jen (50%) hajonta on samaa suuruusluokkaa kuin suurimmalla osalla muista mutaatiostandardeista (kuvio 9). Pienessä otoksessa (N=6) yksittäisillä poik- keavilla arvoilla on suuri vaikutus hajontaan.



Kuvio 9. AmoyDx-kitin standardien tulosten vaihtelu esitettyä laatikkojanaku- viona.

5.3 Kittien vertailu

Näytepitoisuudella 3 ng/μl testatuista 24 näytteestä 23:lla saatiin Therascreen-kittiä vastaavat positiiviset tai negatiiviset tulokset. Tulokset on esitetty liitteenä olevassa taulukossa (Liite 3). Samojen näytteiden Therascreen-kitillä aikaisemmin tehdyt tulokset näkyvät liitteen 4 taulukossa. Näytteen 6 Ct-arvo oli positiivinen G719X-alukkeilla (Liite 3), mutta se analysoitiin negatiiviseksi AmoyDx-kitin ohjeessa (AmoyDx EGFR29 Mutations Detection Kit -ohje) ilmoitettujen Δ Ct-raja-arvojen mukaisesti (Taulukko 2, sivu 20). Therascreen-kitillä kyseinen näyte on positiivinen G719X-mutaation suhteen (Liite 4).

AmoyDx-kitissä mukana olevalle L861Q-mutaatiomikseille ei ollut näyteaineistossamme mukana tunnettua positiivista näytettä. Tämä mutaatio on harvinainen laboratorion aineistossa. L861Q-standardille saatiin kuitenkin kitin viitearvojen ($Ct < 20$) mukaiset tulokset (Taulukko 3 ja Kuvio 9, s. 25) ja voitiin todeta kitin reagenssien toimivan hyvin myös tämän mutaation kohdalla.

Kittien samankaltaista toimintaa osaltaan varmentavat näyteaineistossamme olleet kaksi tulokseltaan selvästi muista poikkeavaa näytettä. Molemmista näytteistä saatiin aiempia Therascreen-kitin tuloksia vastaavat tulokset myös AmoyDx-kitillä. Toisen näytteen (näyte 11) kontrolli-Ct-arvo oli hyvin korkea molemmilla kiteillä, kun taas näytteen 7 kontrolli-Ct-tulos oli negatiivinen molemmilla kiteillä (Liitteet 3 ja 4).

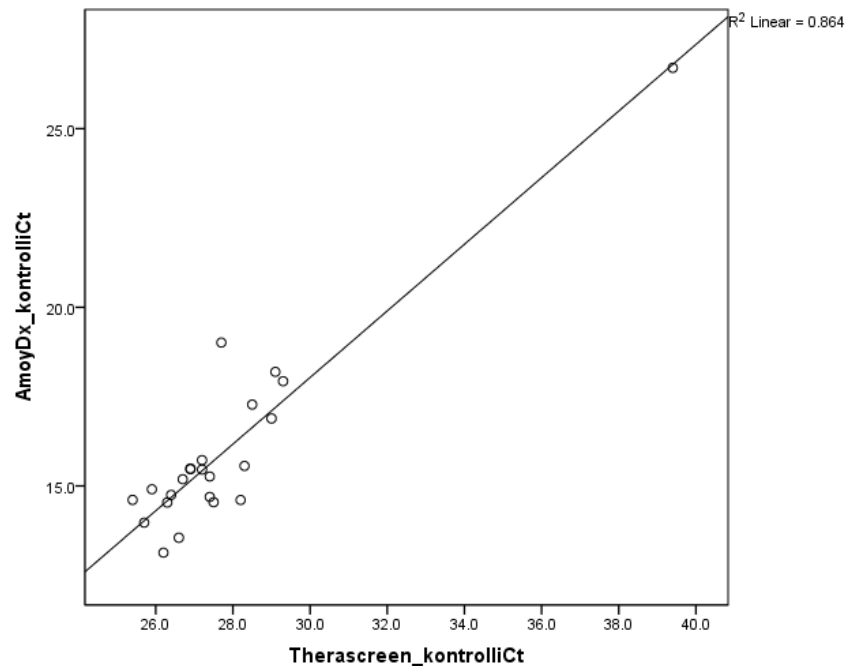
Kittien tulosten riippuvuuden määrittämiseksi tehtiin korrelaatiotestauksia SPSS-ohjelmistolla. Kontrolleja (kontrolli-Ct-arvot) testattaessa tuloksena saadun Pearsonin korrelaatiokertoimen ($r = 0,929$) mukaisesti muuttujien välillä vallitsi voimakas positiivinen korrelaatio ja korrelaatio oli merkitsevää (Sig. $< 0,001$, Taulukko 4, s. 27).

Taulukko 4. Korrelaatiokerroin kittien kontrolli-Ct-arvoista laskettuna.

		AmoyDx kontrolli	Therascreen kontrolli
AmoyDx_controlCt	Pearson Correlation	1	.929**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	23	23
Therascreen_controlCt	Pearson Correlation	.929**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	23	23

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Sama nähdään myös sirontakuviassa (Kuvio 10), jossa muuttujat asettuvat regressiosuoran läheisyyteen. Toisin sanoen TheraScreen-kitillä saadun tuloksen suurentuessa myös AmoyDx-kitillä saatu tulos yleensä suurenee. Selitystasteen R^2 (Kuvio 10) mukaisesti AmoyDx-kitin kontrollien tuloksista 86% pystytään selittämään Therascreen-kitin tulosten avulla.



Kuvio 10. Sirontakuviokittien kontrolliarvojen riippuvuudesta.

Regressiosuoran kertoimet on esitetty taulukossa 5. Regressiosuoran yhtälön ($y = 0,933x - 9.970$) perusteella voidaan ennustaa, että Therascreen kontrollien tulosarvon muuttuessa 1 yksikön AmoyDx-kitin tulosarvo muuttuu 0,933 yksiköä (Taulukko 5).

Taulukko 5. Regressiosuoran yhtälön kertoimet/ kontrolliarvot.

Kittien vertailu/ Regressiosuoran yhtälön kertoimet ^a					
		Ei-standardoidut kertoimet		Standar- doidut ker- toimet	
Model		B	Std. Error	Beta	t Sig.
1	(Vakio)	-9.970	2.246		-4.440 .000
	Therascreen- kitti	.933	.080	.930	11.605 .000

a. Riippuva muuttuja: AmoyDx-kitti

Kittien välistä korrelaatiota testattiin myös mutaatioposiitivisten näytteiden mutaatio-Ct- ja Δ Ct-arvojen osalta, mutta niille ei saatu merkittävää korrelaatiota. Tämä todennäköisesti johtuu qPCR-ajojen erilaisista olosuhteista ja kittien eroista, mikä korostuu mutaatioposiitivisten tulosten kohdalla.

Kittien kontrolli-Ct-, mutaatio-Ct ja Δ Ct-arvoille määritettiin tunnuslukuja SPSS-ohjelmistolla (Taulukko 6, s. 29). Tunnuslukujen avulla laskettiin variaatioker-
toimet kontrolli-Ct-, mutaatio-Ct- ja Δ Ct-tuloksille (Taulukko 7, s. 29).

Taulukko 6. Kittien vertailua tunnuslukujen avulla.

	N	Minimi	Maksimi	Keskiarvo (k.a.)	Keskihajonta (k.h.)
AmoyDx_kontrolliCt	23	13.1	26.7	16.0	2.8
Therascreen_kontrolliCt	23	25.4	39.4	27.8	2.8
AmoyDx_mutaatioCt	12	18.0	27.7	21.6	2.7
Therascreen_mutaatioCt	12	29.1	33.7	31.6	1.6
AmoyDx_deltaCt	12	2.5	10.3	5.7	2.3
Therascreen_deltaCt	12	1.0	6.1	4.0	1.5

Tuloksista havaitaan, että kaikissa ryhmissä AmoyDx-kitin suhteelliset hajonnat ovat suurempia verrattuna Therascreen-kitin arvoihin. Δ Ct-arvojen kohdalla hajonta on AmoyDx-kitillä 41% ja Therascreen-kitillä 36% (Taulukko 7).

Taulukko 7. Kittien vertailu variaatiokertoimien (suhteelliset hajonnat) avulla.

NÄYTTEET	VARIAATIOKERROIN (k.h./k.a.) \times 100%
AmoyDx-kitti/ kontrolli-Ct	17,3%
TheraScreen-kitti/ kontrolli-Ct	9,9%
AmoyDx-kitti/ mutaatio-Ct	12,6%
TheraScreen-kitti/ mutaatio-Ct	5,1%
AmoyDx-kitti/ ΔCt	41,2%
TheraScreen-kitti/ Δ Ct	36,1%

Tilastollista parierojen testausta varten tehtiin normaalijakaumatestaus AmoyDx- ja Therascreen-kittien mutaatio- Δ Ct-arvoista (Taulukko 8, s. 30).

Taulukko 8. Normaalijakaumatestaus mutaatio- Δ Ct-arvoille.

	Kitti	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
MutDeltaCt	AmoyD	.175	12	.200 [*]	.950	12	.636
	Theras	.093	12	.200 [*]	.967	12	.881

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Molemmissa ryhmissä merkitsevyudeksi saatiin $p > 0.05$ eli molempien kittien tulosryhmät todettiin normaalisti jakautuneiksi. Tämän perusteella voitiin tehdä parierojen t-testi mutaatio- Δ Ct-arvoille (Taulukko 9).

Taulukko 9. Kittien vertailu parierojen t-testin avulla mutaatio- Δ Ct-arvoille.

	Parierot							Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. De- viation	Std. Error Mean	Eron 95% luottamusväli		t	df	
				Lower	Upper			
AmoyDx_ΔCt	1.6127	2.5312	.7307	.0045	3.2210	2.207	11	.049
Therascreen_ΔCt								

Testattaessa parieroja Δ Ct-arvojen välillä tilastolliseksi merkitsevyudeksi saatiin $p < 0,05$ (Sig. 0,049) (Taulukko 9) Tällöin nollahypoteesi hylätään ja vastahypoteesi astuu voimaan. Toisin sanoen t-testin perusteella ero kittien Δ Ct-tulosten välillä on tilastollisesti jokseenkin merkitsevää. Myös tämä tulos todennäköisesti selittyy kittien qPCR-ajojen erilaisilla olosuhteilla ja kittien eroavaisuuksilla.

6 POHDINTA

6.1 Tulosten luotettavuuden arviointi

PCR-menetelmän suuren herkkyyden vuoksi se on hyvin altis kontaminaatioille (Wilson & Walker 2001). Tähän kiinnitettiin erityistä huomiota pipetoinnissa. Pipetointi tehtiin aseptisesti laminaarivirtauskaapeissa käyttäen suodattimella varustettuja steriilejä pipetinkärkiä, suojatakia ja kertakäyttökäsineitä. PCR-reaktiomiksien pipetointi tapahtui erityisessä sulkuutilalla eristetyssä huoneessa.

qPCR-ajoissa oli mukana useita kontrolleja PCR:n toimivuuden ja tulosten luotettavuuden määrittämiseksi. Kullekin PCR-reaktiolle negatiivisena kontrollina käytettiin PCR-vettä. Reaktiomiksien kontaminaatio olisi todennäköisesti näkynyt vesikontrollissa PCR-monistumisena. Positiivisena kontrollina PCR-ajoissa toimi kitin standardi-DNA. Sen avulla määritettiin kitin reagenssien toimivuutta ja ajojen toistettavuutta. Tehdyissä PCR-ajoissa kaikki vesikontrollit antoivat negatiivisen ja standardit positiivisen viiterajojen mukaisen tuloksen. Näiden kontrollien perusteella PCR-ajoja voidaan pitää onnistuneina ja kontaminaatiovapaina. Myös tutkittuja näytteitä voitiin pitää laadullisesti soveltuvana testaukseen, sillä DNA-näytteet oli säilytetty asianmukaisesti +4 °C:een lämpötilassa.

Tutkimusaineisto oli pieni johtuen EGFR-mutaatiotestauksen korkeista kustannuksista, eikä esimerkiksi rinnakkaisia määryksiä potilasnäytteistä kyetty projektin puitteissa tekemään. Tämän vuoksi aineistosta tehtyjä tilastollisia analyysejä voidaan pitää ainoastaan suuntaa-antavina. Myös mahdolliset pipetointivirheet korostuvat pienessä aineistossa eikä niitä saada eliminoidua samalla tavalla kuin suuresta aineistosta, esimerkiksi laskettaessa hajontoja. Kittien erilainen sisältö, erilaiset käytetyt qPCR-olosuhteet sekä saatujen tulosarvojen erilainen suuruusluokka osaltaan vaikuttivat siihen, että tilastollisille testeille voidaan antaa vain vähäinen painoarvo tässä opinnäytetyössä.

Potilasnäytteiden tulokset vastasivat kuitenkin hyvin aikaisempia Therascreen-kitillä saatuja tuloksia positiivinen/negatiivinen-määryksinä. Koska valmistaja

on tehnyt varsinainen AmoyDx-kitin validoinnin, aineisto voitiin katsoa riittäväksi kitin toiminnan varmistamiseen.

6.2 Opinnäytetyön eettisten näkökohtien tarkastelu

Tietosuojalainsäädännön keskeisenä pyrkimyksenä on ihmisten henkilötietojen asianmukaisen käsittelyn takaaminen. Tutkimuksen näkökulmasta henkilötietojen käsittelyä ovat kaikki vaiheet tutkimusaineiston keräämisestä tulosten arkistointiin. (Kuula 2011.) Tärkeä osa tutkimustoiminnan etiikkaa on luotettavan informaation tuottaminen, mihin kuuluu myös tulosten tulkinta ja selittäminen (Pietarinen 2002).

Opinnäytetyössä käsiteltiin potilasnäytteitä, joissa oli potilaiden tunnistetta. Tieto- ja yksityisyydensuojan säilyttämiseksi näytteitä käsiteltiin luottamuksellisesti. Näytteisiin liittyvät nimitarrat ja potilastietopaperit hävitettiin tietosuojajätteisiin. Lisäksi opinnäytetyön raportoinnissa käytetyt näytenumerot on muutettu niin, ettei yhdistäminen alkuperäisiin potilasnäytteisiin ole mahdollista. Opinnäytetyön kirjoitusvaiheessa pyrittiin kiinnittämään erityistä huomiota koejärjestelyiden ja tulosten tarpeeksi yksityiskohtaiseen ja selkeään raportointiin sekä tulosten luotettavuuden arviointiin.

6.3 Johtopäätökset

Johtopäätöksenä voidaan todeta AmoyDx:n kitin soveltuvan HUSLABin EGFR-mutaatiotestauksiin. Eri mutaatioille annetut raja-arvot tulevat todennäköisesti vielä tarkentumaan käsiteltäessä suurempia näytemääriä. L861Q-mutaation osalta tulisi kitin toimintaa vielä testata erikseen, mikä edellyttää positiivista potilasnäytettä.

Tulosten perusteella AmoyDx-kitin PCR-tehokkuus on parempi kuin käytössä olevan kitin, mikä mahdollistaa EGFR-mutaatiotestausten tekemisen hyvin pienistäkin näytemääristä. Etuna uudessa kitissä on myös sen sisältämät alukkeet T790M-resistenssimutaatiolle. Resistenssimutaation havaitseminen analyysis-

sä auttaa mahdollisesti ennakoimaan lääkevasteen käyttäytymistä ja sitä kautta potilaan jatkohoidon suunnittelua.

Opinnäytetyölle asetetut tavoitteet saavutettiin ja koska AmoyDx-kitin verifiointi katsottiin onnistuneeksi, kitin käytöstä kirjoitettiin työohje (EGFR-geenin mutaatioanalyysi kudospäytteestä/ AmoyDx-kitti) laboratorion käyttöön.

LÄHTEET

- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J. ym. 1994. Molecular biology of the cell. 3.painos. New York: Garland Science.
- Amado, R.G.; Wolf, M.; Peeters, M.; ym. 2008. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology*. Vol. 26, 1626-1634.
- AmoyDx EGFR29 Mutations Detection Kit (AmoyDx-kitin ohje) 2012.
- ARMS-tekniikka. Viitattu 27.11.12. http://www.qiagen.com/literature/qiagennews/weeklyarticle/11_07/e18/default.aspx.
- Arya, M; Shergill, I.S.; Williamson, M. ym. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Review. Expert Rev. Mol. Diagn.* Vol. 5, 209-219.
- Balak, M.N.; Gong, Y.; Riely, G.J. ym. 2006. Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clinical cancer research*. Vol.12, No. 21, 6494-6501.
- Bethune, G.; Bethune, D.; Ridgway, N. ym. 2010. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer: an overview and update. *J Thorac Dis*. Vol. 2, 48-51.
- Elenius K. 2006. Epidermaalisen kasvutekijän reseptorin estäjät syövän hoidossa. *Duodecim*. Vol. 122, 1331-1338.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. Vol. 100, 57-70.
- Heid, C.A.; Stevens, J.; Livak, K.J. & Williams, P.M. 1996. Real time Quantitative PCR. *Genome Research*. Vol. 6, 986-994.
- Heikkilä, T. 2005. Tilastollinen tutkimus. 5.-6. painos. Helsinki: Edita Prima Oy.
- Hidalgo, M. 2008. Clinical development of epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors: what lessons have we learned? Teoksessa Colotta, F. & Mantovani, A. (toim.) Targeted therapies in cancer. Myth or reality? New York: Springer Science+Business media, LLC.
- Hirsjärvi, S.; Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. Tutki ja kirjoita. 15., uudistettu painos. Helsinki: Tammi.
- HUSLAB ohjekirja 2012. EGFR-geenin mutaatiotesti, kudosnäytteestä. Viitattu 20.11.12. http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=20842&terms=egfr.
- Ilonen, I. 2011. Non-small cell lung cancer studies on pathogenesis, tumour targeting and treatment outcomes. Väitöskirja. Lääketieteellinen tiedekunta.Helsinki: Unigrafia.
- Kallioniemi, O. & Mäkelä, T. 2006. Syöpälääkkeiden haasteet ja näkymät. *Duodecim*, 122, 985-994.
- Kamel-Reid, S.; Chong, G.; Ionescu, D.N. ym. 2012. EGFR tyrosine kinase mutation testing in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Review. Current Oncology*. Vol. 19, 67-74.
- Kervinen, J. & Gahmberg, C.G. 2004. Syövän täsmälääkkeet ja niiden kehitystyö. *Duodecim*. No. 120, 2323-2330.

Kuula, A. 2011. Tutkimusetiikka. Aineistojen hankinta, käyttö ja säilytys. Jyväskylä: Bookwell Oy.

Lewin, B. 1994. Genes V. New York: Oxford University Press Inc.

Moreira, A. & Thornton, R.H. 2012. Personalized medicine for non-small-cell lung cancer: implications of recent advances in tissue acquisition for molecular and histologic testing. Review. Clinical lung cancer. Vol. 13, No. 5, 334-339.

Newton, C.R.; Graham, A.; Heptinstall, L.E. ym. 1989. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic acids research. Vol.17, No. 7, 2503-2516.

Orpana, A. & Huoponen, K. 2006. Geeni- ja kromosomitutkimusten laboratoriodiagnostiikka. Teoksessa Aula, P., Kääriäinen, H. & Palotie, A. (toim.) Perinnöllisyyslääketiede. 3. painos. Helsinki:Duodecim. 268-280.

Paez, J. G.; Jänne, P.A.; Lee, J.C. ym. 2004. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. Science Vol. 304, No. 4, 1497-1500.

Peled, N.; Yoshida, K.; Wynes, M.W. & Hirsch, F.R. 2009. Predictive and prognostic markers for epidermal growth factor receptor inhibitor therapy in non-small cell lung cancer. Review. Therapeutic Advances in Medical Oncology. Vol. 1, No. 3, 137-144.

Pietarinen, J. 2002. Eettiset perusvaatimukset tutkimustyössä. Teoksessa Karjainen, S., Launis, V., Pelkonen, R. & Pietarinen, J. (toim.) Tutkijan eettiset valinnat. Helsinki: Gaudeamus Kirja. Oy Yliopistokustannus University Press Finland Ltd.

Riely, G.J.; Pao, W.; Pham, D. ym. 2006. Clinical course of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon21 mutations treated with gefitinib and erlotinib. Clinical Cancer Research. Vol.12, No. 3, 839-844.

Scorpions-koetin. Viitattu 19.11.12. <http://ccrhawaii.org/index.php/nucleic-acid-techniques/22-nucleic-acid-amplification-a-sequencing/22a-polymerase-chain-reaction-amplifying-nucleic-acids/22a-content-tutorial>.

Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S. ym. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, Vol. 239, 487-491.

Taguchi, F.; Solomon, B.; Gregorc, V. ym. 2007. Mass spectrometry to classify non-small-cell lung cancer patients for clinical outcome after treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: a multicohort cross-institutional study. J Natl Cancer Inst, Vol. 99, 838-846.

Thellwell, N.; Millington, S.; Solinas, A. ym. 2000. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. Vol. 28, No. 19, 3752-3761.

TheraScreen EGFR PCR-kit handbook. 2010. Qiagen Manchester Ltd.

Tilastokeskus 2012. 2.11 Hajontaluvut- variaatiokerroin. Viitattu 24.10.12. <http://www.stat.fi/tup/verkkokoulu/data/tt/02/11/index.html>.

Tohtori.fi 2012. Lääkeopas. Viitattu 20.11.12. <http://www.tohtori.fi/laakeopas/laake/17635-TARCEVA>.

Wikipedia 2012. Epidermal growth factor receptor > EGFR signaling pathway.png. http://en.wikipedia.org/wiki/File:EGFR_signaling_pathway.svg.

Wilson, K & Walker, J. 2001. Principles and Techniques of practical biochemistry. 5. painos. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Zhang, H.; Berezov, A.; Wang, G. ym. 2007. ErbB receptors:from oncogenes to targeted cancer therapies. The Journal of Clinical Investigation. Vol. 117, No. 8, 2051-2058.

Zhou, C.; Wu, Y-L.; Chen, G. ym. 2011. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: a multicentre, open-labe, randomised, phase 3 study. Lancet Oncol. Vol. 12, 735-742.

JULKAISEMATTOMAT LÄHTEET:

EGFR-geenin mutaatioanalyysi kudospäytteestä (Therascreen-kitin ohje). HUSLAB:n genetiikan laboratorion työohje 2012.

EGFR-geenin mutaatioanalyysi kudospäytteestä/ AmoyDx-kitti (AmoyDx-kitin ohje). Työohje 2012.

Opinnäytetyön tutkimuslupahakemus sivu 1/2.



HELSINGIN JA UUDENMAAN
SAIRAANHOITOPIIRI

OPINNÄYTETYÖN TUTKIMUSLUPAHAKEMUS Liite 1

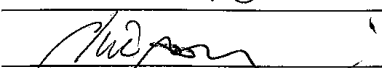
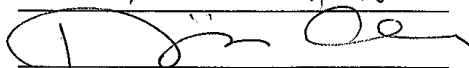
Opinnäytetyön tekijää koskevat tiedot	Suku- ja etunimet Toivanen Anne Pauliina		
	Virka/toimi tai oppiarvo/koulutustausta Bioanalytiikan opiskelija		
	HUS:n palveluksessa <input type="checkbox"/> Kyllä <input checked="" type="checkbox"/> Ei		
	Sähköpostiosoite/puh/gsm anne.toivanen@yahoo.com		
	Kotiosoite Suuntimotie 14 D 22, 00760 Helsinki		
	Yliopisto ja laitos/Ammattikorkeakoulu/oppilaitos, jossa opiskelee Turun ammattikorkeakoulu		
	Yliopiston laitoksen/Ammattikorkeakoulu/oppilaitoksen osoite Ruuskatu 8, 20720 Turku		
Opinnäytetyön ohjaaja oppilaitoksessa	Opinnäytetyön ohjaaja(t), ohjaajien oppiarvot ja yhteystiedot (sähköposti/puhelin) Leila Tiilikka, FM, koulutuspäällikkö. S-posti: Leila.Tiilikka(att)turkuamk.fi		
	Opinnäytetyön ohjaaja(t), ohjaajien ilmoitus siitä, onko opinnäytetyön tutkimussuunnitelma hyväksytty esitetyssä muodossa Opinnäytetyön tutkimussuunnitelma on hyväksytty esitetyssä muodossa		
HUS:n vastuuhenkilöä koskevat tiedot	Suku- ja etunimi/virka/toimi Kytölä Soili/Sairaageneetikko		
	Työpaikan osoite Genetiikan laboratorio, HUSLAB, Haartmaninkatu 2, 00029 HUS		
	Sähköpostiosoite/puh/gsm Soili.Kytola(att)hus.fi		
Opinnäytetyötä koskevat tiedot	HUS:n tulosalue, tulosyksikkö tai liikelaitos, jossa vastuuhenkilö työskentelee Patologian ja genetiikan vastuualue, Genetiikan laboratorio		
	Opinnäytetyön nimi julkisessa muodossa Uuden EGFR-mutaatiokitin verifiointi		
	<p>Lyhyt selostus opinnäytetyön suorittamisesta HUS:ssa julkisessa muodossa (kirjasinkoko 10)</p> <p>Tarkoituksena on verifioida uusi, AmoyDX:n Epidermaalisen kasvutekijäreseptorin (EGFR) -mutaatiokitti tällä hetkellä genetiikan laboratoriossa käytössä olevan, vuoden lopussa markkinoilta poistuvan TheraScreen-kitin tilalle. Tarkoituksena on ajaa potilasnäytteistä rinnakkaiset mutaatiotutkimukset molemmilla kiteillä, arvioida tulosten perusteella uuden kitin toimivuutta sekä mahdollisesti kirjoittaa uusi työohje</p>		
	Asiasanat (max 5 kpl) EGF-reseptori, kvantitatiivinen PCR, mutaatiotestaus, ei-pienisoluinen keuhkosyöpä		
	Opinnäytetyön taso <input type="checkbox"/> Lisensiaattitutkinto <input type="checkbox"/> Maisteri tutkinto <input type="checkbox"/> Ylempi AMK tutkinto <input type="checkbox"/> Kandidaatti <input checked="" type="checkbox"/> AMK tutkinto <input type="checkbox"/> Muu, mikä?		Opinnäytetyön tieteellinen <input type="checkbox"/> Lääketiede <input type="checkbox"/> Hammaslääketiede <input type="checkbox"/> Hoitotiede <input type="checkbox"/> Terveystieteiden tiede <input checked="" type="checkbox"/> Muu, mikä? Terveystiede
	Opinnäytetyö on osa laajempaa HUS -hanketta? <input checked="" type="checkbox"/> Ei <input type="checkbox"/> Kyllä, mitä?		Arvioitu aloituspvm. 23.4.2012
			Arvioitu päättymispvm. 25.5.2012
	Opinnäytetyön suorituspaikat HUS:ssa		
	<input type="checkbox"/> HUS konsernihallinto <input type="checkbox"/> HYKS-sairaanhoidtoalue <input type="checkbox"/> HYKS Medisiininen tulosyksikkö <input type="checkbox"/> HYKS Naisten- ja lastentautien tulosyksikkö <input type="checkbox"/> HYKS Operatiivinen tulosyksikkö <input type="checkbox"/> HYKS Psykiatrian tulosyksikkö <input type="checkbox"/> Hyvinkään sairaanhoitoalue <input type="checkbox"/> Lohjan sairaanhoitoalue <input type="checkbox"/> Länsi-Uudenmaan sairaanhoitoalue <input type="checkbox"/> Porvoon sairaanhoitoalue <input type="checkbox"/> HUS-Apteekki <input type="checkbox"/> HUS-Desiko <input type="checkbox"/> HUS-Kiinteistöt Oy <input type="checkbox"/> HUS-Logistiikka <input type="checkbox"/> HUS-Lääkintätekniikka <input type="checkbox"/> HUS-Röntgen <input type="checkbox"/> HUS-Servis <input type="checkbox"/> HUS-Tilakeskus <input checked="" type="checkbox"/> HUSLAB <input type="checkbox"/> Ravioli <input type="checkbox"/> Uudenmaan sairaalapesula Oy <input type="checkbox"/> Muu, mikä		

15032010_TK/RM

Opinnäytetyön tutkimuslupahakemus sivu 2/2.

Kohderyhmä <input type="checkbox"/> Potilaat <input type="checkbox"/> Omaiset <input type="checkbox"/> Henkilökunta <input type="checkbox"/> Asiakirjat <input checked="" type="checkbox"/> Muu, mikä? verifiointi laboratorioille		Tutkittavien/havaintoyksikköjen määrä Mutaatiotestauksen näytemäärät ovat n. 30kpl/viikko.
Aineiston keruumenetelmä <input type="checkbox"/> Kysely <input type="checkbox"/> Haastattelu <input type="checkbox"/> Havainnointi <input type="checkbox"/> Asiakirja-analyysi <input checked="" type="checkbox"/> Muu, mikä? Diagnostiikan näytteitä		
HUS:n ulkopuoliset yhteistyötahot -		
Aiheuttaako opinnäyte kustannuksia HUS:lle? <input type="checkbox"/> Kyllä (Kustannusarvio ja rahoitussuunnitelma erillisellä liitteellä) <input checked="" type="checkbox"/> Ei (Tutkimusluvan myöntäjä voi vaatia selvitystä tapauskohtaisesti)		Opinnäytetyön hyödyt/vaikutukset HUS:n toimintaan <input checked="" type="checkbox"/> Väitön soveltuvuusarvo toimintaan, mihin <input type="checkbox"/> Ei väitöntä sovellettavuutta
Opinnäytetyön tekijänä sitoudun noudattamaan sairaalan antamia ohjeita ja sääntöjä ja raportoimaan opinnäytetyöni tuloksista tutkimusluvan myöntäjälle.		
Päiväys 20.4.2012  Opinnäytetyön tekijä/tekijät nimenselvitys Anne Toivanen		Päiväys 20.4.2012  HUS:n vastuhenkilö nimenselvitys Soili Kytölä

Alla olevaa päätöskohtaa käytetään silloin, kun päätös voidaan antaa lomakepäätöksenä (kts. JYL 1/2010, kohta 4.3)

LOMAKE-PÄÄTÖS	<input type="checkbox"/> Myönnetään hakemuksen mukaisesti <input type="checkbox"/> Myönnetään edellyttäen, että <input type="checkbox"/> Hakemus hylätään seuraavin perusteluin *) *) Oikaisuvaatimusohje liitteenä	
	Tutkimusluvan alkamispäivä 23.4.2012	Tutkimusluvan päättymispäivä * 25.5.2012 31.12.2012
	Päiväys 7.5.2012 	Päiväys 3/5 2012 Helsinki 
	Tutkimusluvan myöntäjä nimenselvitys Pia Aarnisalo vs. toimitusjohtaja Laboratoriolaboratorio HUSLAB	Tutkimusluvan puolesta HUSissa nimenselvitys Tuija Ohranen

Tarvittavat liitteet

- ☒ Opinnäytetyön suunnitelma ja selostus opinnäytetyön suorittamisesta HUS:ssa
☐ Aineiston keruulomake
☐ Kysely/haastattelulomakkeen saatekirje

Lisäksi tarvittaessa

- ☐ Opinnäytetyötä suorittava muu henkilöstö
☐ Kustannusarvio ja rahoitussuunnitelma
☐ Hakemus tietojen saamiseksi salassa pidettävistä asiakirjoista
☐ Valtiositoumus/ salassapito- ja käyttäjäsitoumus
☐ Tutkittavan tiedote ja suostumus
☐ Eettisen toimikunnan lausunto
☐ STM:n lupa
☐ Henkilörekisteriseloste

* KOKOJAUS
 Tuija Ohranen

15032010_TK/RM

Tekijä:	
Kone:	

	Numero ja nimi	DNA-kons. ng/μl	DNA-laimennos 3 ng/μl	H ₂ O
1.			#JAKO/0!	#JAKO/0!
2.			#JAKO/0!	#JAKO/0!
3.			#JAKO/0!	#JAKO/0!
4.			#JAKO/0!	#JAKO/0!
5.			#JAKO/0!	#JAKO/0!
6.			#JAKO/0!	#JAKO/0!
7.			#JAKO/0!	#JAKO/0!
8.			#JAKO/0!	#JAKO/0!
9.			#JAKO/0!	#JAKO/0!
10.			#JAKO/0!	#JAKO/0!
			PCR-vesi lot:	

1) Käynnistä ABI 7500 Real-time PCR -laitteisto ainakin 10 min ennen ajoa.

2) Vie ajo-ohjelma muistitikulla laitteelle ja avaa ajo.

3) Tallenna tiedosto ennen ajoa D-asemalle.

4) Laske tarvittava määrä mixiä, yhteensä 8 miksiä (mix 1, mix 2... ja mix 8).

Jos platta on täysi, laita PCR-mixin kertoimeksi 12 eli potilasmäärä + vesi + Standardi.

(pipetointivara 20 μl on lisätty laskukaavaan.)

5) Laita reagenssit (Reaktiomixit 1-8) sulamaan huoneen 524 laminaarikaappiin.

6) HUOM! myös Taq DNA polymeraasin on oltava huoneenlämpöistä ennen käyttöä.

7) Ota PCR-vettä ja Mixed Standard sulamaan huoneen 522 laminaarikaappiin.

8) Laimenna näytteet eppendorffputkiin **3 ng/μl** (3 / DNA-kons. x 100) huoneessa 522.

(Platalle menee näytettä yhteensä 40 μl + pipetointivara eli ajoon riittää 50 μl näytelaimennosta.

Muuta kaavaa tarvittaessa).

9) Pipetoi näytelaimennosta, PCR-vettä ja mixed standardia **4.7 μl** 96-paikkaiselle kuoppalevyille.

Pipetoi laimennettua näytettä kaivoihin A1-H1 (näyte 1), A2-H2 (näyte 2) jne.

Pipetoi vettä kaivoihin (NTC) A11-H11.

Pipetoi Mixed Standardia (STD) kaivoihin A12-H12.

10) Siirry huoneeseen 524. Valmista mixit. Pipetoi jokainen reaktioseos omaan eppendorffputkeensa sekä lisää Taq DNA polymeraasi.

AmoyDx EGFR29 Mutations	Lot.
Detection Kit	

	PCR-mixit	Lot.	Reaktioseos μl	Taq polymeraasi μl
			x kpl Näytteitä (+2)	x kpl Näytteitä (+2)
1	Deletion Reaction Mix		20	0.2
2	L858R Reaction Mix		20	0.2
3	T790M Reaction Mix		20	0.2
4	Insertions Reaction Mix		20	0.2
5	G719X Reaction Mix		20	0.2
6	S768I Reaction Mix		20	0.2
7	L861Q Reaction Mix		20	0.2
8	Control Reaction Mix		20	0.2
9	Mixed standard			
10	Taq DNA polymeraasi			

11) Siirry huoneeseen 522 ja pipetoi kaikki tekemäsi reaktioseokset korkittoman stripin kuoppiin,

ylimpään Deletion mix jne.

12) Pipetoi harava-pipetillä **35.3 μl** kutakin reaktiomiksiä stripiltä näytteiden päälle, ensin kaivoihin

1A-1H ja uusilla kärjillä 2A-2H jne, sekoita miksiä ja näytettä pipetillä välttäen ilmakuplia.

13) Peitä platta huolellisesti suojakalvolla.

14) Sentrifugoi platta huoneessa 515, laita näytteet ABI 7500 Real-time PCR -laitteeseen

15) Käynnistä laite.

16) Tallenna tiedosto ajon jälkeen tikulle.

17) PCR-tuotteita/96-paikkaista kuoppalevyä ei säilytetä vaan ne/se hävitetään erillisten jätehuolto-ohjeiden mukaan.

Liite 3. AmoyDx-kitin qPCR-ajojen tulokset. DNA-pitoisuus näytteissä 3 ng/ml.

näyte		19Del.	L858R	T790M	Ins.	G719X	S768I	L861Q		Res.
AmoyDx:	Control Ct	mut. Ct ΔCt	mut. Ct ΔCt	mut. Ct ΔCt	mut. Ct ΔCt	mut. Ct ΔCt	mut. Ct ΔCt	mut. Ct ΔCt	TULOS:	mut.
1	13.6			28.5 14.9		19.4 5.8			G719X	+
2	14.6								neg.	
3	14.5					21.5 7.0	19.7 5.1		G719X + S768I	
4	14.7								neg.	
5	15.6								neg.	
6	19.0			30.5 11.5		27.7 8.7			neg.	+
7	-								ei tulosta	
8	14.9								neg.	
9	14.9	25.2 10.3							19Del.	
10	15.3								neg.	
11	26.7								neg.	
12	18.2		22.0 3.8				21.3 3.1		L858R + S768I	
13	15.5								neg.	
14	14.5				19.2 4.6				Ins.	
15	15.5	18.0 2.5							19Del.	
16	15.7								neg.	
17	14.7								neg.	
18	15.2								neg.	
19	17.3	21.8 4.5							19Del.	
20	15.5								neg.	
21	14.0			28.0 14.0					neg.	+
22	16.9			31.0 14.1					neg.	+
23	17.9	22.7 4.8							19Del.	
24	13.1	20.6 7.5		28.8 15.6					19Del.	+

Liite 4. Therascreen-kitin qPCR-ajojen tulokset.

näyte		19Del.	L858R	T790M	Ins.	G719X	S768I	L861Q	
	Control Ct	mut. Ct ΔCt	mut. Ct ΔCt	mut. Ct ΔCt	mut. Ct ΔCt	mut. Ct ΔCt	mut. Ct ΔCt	mut. Ct ΔCt	TULOS:
1	26.6					32.6 6.0			G719X
2	28.2								neg.
3	27.5					32.7 5.1	33.7 6.1		G719X + S768I
4	27.4								neg.
5	28.3								neg.
6	27.7					32.6 4.9			G719X
7	-								ei tulosta
8	25.9								neg.
9	25.4	29.1 3.6							19Del.
10	27.4								neg.
11	39.4								neg.
12	29.1		32.9 3.8				33.5 4.3		L858R + S768I
13	27.2								neg.
14	26.3				31.0 4.7				Ins.
15	26.9	30.1 3.1							19Del.
16	27.2								neg.
17	26.4								neg.
18	26.7								neg.
19	28.5	31.1 2.6							19Del.
20	26.9								neg.
21	25.7								neg.
22	29.0								neg.
23	29.3	30.3 1.0							19Del.
24	26.2	29.5 3.3							19Del.